



Étude des interactions hôte/virus chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, et son virus Ostreid herpesvirus 1

Amélie Segarra

► To cite this version:

Amélie Segarra. Étude des interactions hôte/virus chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, et son virus Ostreid herpesvirus 1. Biologie animale. Université de Bretagne Sud, 2014. Français. NNT : 2014LORIS344 . tel-01192622

HAL Id: tel-01192622

<https://theses.hal.science/tel-01192622>

Submitted on 3 Sep 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE / UNIVERSITE DE BRETAGNE-SUD
sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE-SUD
Mention Biologie Santé
Ecole doctorale SICMA

Présentée par

Segarra Amélie

Préparée à

Ifremer La Tremblade,
Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins

Etude des interactions hôte/virus chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* et son virus *Ostreid herpesvirus 1*

Thèse soutenue le 14 novembre 2014

devant le jury composé de :

Brémont Michel

Directeur de recherche, INRA de Jouy-en-Josas / Rapporteur

Thiery Richard

Directeur de recherche, Anses Laboratoire de Sophia-Antipolis / Rapporteur

Agut Henri

Professeur, Hôpital Universitaire Pitié Salpêtrière de Paris / Examinateur

Thiry Etienne

Professeur, Faculté de Médecine Vétérinaire de Liège / Examinateur

Bourgougnon Nathalie

Professeur, Université de Bretagne-Sud/ Directrice de thèse

Renault Tristan

Cadre de recherche III, Ifremer La Tremblade / Co-Directeur de Thèse

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord Messieurs le Docteur Michel Brémont et le Docteur Richard Thiéry d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit.

Je voudrais adresser mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur Henry Agut et Monsieur le Professeur Etienne Thiry pour avoir accepté d'être les examinateurs de cette thèse et membres de mon comité de thèse.

Je remercie l'Ifremer et la région Poitou-Charentes pour le financement de la thèse.

Je remercie le Docteur Sylvie Lapègue, directrice du Laboratoire Génétique et Pathologie des mollusques Marins (LGPM) et Jean Prou, chef de la station Ifremer La Tremblade pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance au Professeur Nathalie Bourgougnon pour avoir acceptée la direction de cette thèse. Merci pour ton accueil au sein du Laboratoire de Biotechnologie et de Chimie Marines (LBCM) de l'université de Bretagne Sud, pour ta bonne humeur et ton hospitalité.

Je remercie tout particulièrement et chaleureusement mon co-directeur de thèse, le Docteur Tristan Renault pour m'avoir guidé tout au long de cette thèse. Merci pour tous tes conseils, ta disponibilité constante, pour tes encouragements, et surtout pour tes discussions scientifiques.

Merci également à Jean-François Pépin, d'avoir cru en moi pour réaliser cette thèse.

Un grand merci à Arnaud Huvet, pour m'avoir donné l'opportunité de découvrir le Laboratoire de Physiologie des invertébrés (Ifremer, Brest), et pour m'avoir formé à la technique des RNAi. Merci pour ton accueil, tes conseils et remarques scientifiques mais aussi et surtout pour ton envie de réaliser toujours et encore plus de collaborations. Je remercie toute son équipe, en particulier Virgile et Jacqueline, mais aussi Mariana, Rossana, Eric et Joana pour leur accueil si chaleureux. Merci également à Charlotte Corporeau et Pierre Boudry pour leur échange scientifique.

Merci à Agnès Travers pour sa disponibilité et ses échanges scientifiques toujours très intéressants. Merci pour le temps que tu m'as accordé que ce soit pour discuter ou lire mes travaux.

Merci à Isabelle Arzul, pour son écoute, son intérêt et tous ces petits ou grands conseils mais également pour l'intérêt que tu as porté de prêt ou de loin à mes travaux de thèse ! Je t'en suis très reconnaissante.

Une énorme merci à Delphine Tourbiez pour m'avoir soutenu, encouragé, pour m'avoir toujours écouté durant ces 3 années de thèse, et pour ta joie de vivre.

Merci à Nicole Faury et Delphine Tourbiez pour m'avoir accompagné durant mes infections expérimentales et ceux même aux heures les plus folles : 7h, 10h, 12h, 15h, 19h ou même 22h (attention aux alarmes après...), vivent les cinétiques !! Merci également à elles pour leur aide permanente au laboratoire.

Je tiens également à remercier Pierrick, mon camarade de bureau et doctorant, pour sa bonne humeur quotidienne, pour tous tes stylos, tes sushis, tes bouteilles d'eau, et surtout pour m'avoir supporté même quand j'avais faim. Merci de n'avoir jamais rien volé dans ma réserve! (J'ai quand même des doutes sur le paquet d'M&M's....).

Merci à l'ensemble de l'équipe pathologie, de nouveau à Tristan, à Isabelle, à Agnès, à Delphine, à Nicole, à Gwen, mais aussi à Bruno et ses pauses cafés, à Philippe, à Valérie, à Pierrick, à Céline, à Jean-Pierre, à Cyrille. Je remercie également Coralie.

Je remercie l'ensemble de l'équipe Génétique : Sylvie, Lionel, Christophe, Raphaël, Abdellah, Elise, Serge, Florence, Pascal.

Je remercie aussi tout le personnel administratif du laboratoire, Florence Rivet, Martine Grasset et Véronique Betto.

Merci à Christelle pour m'avoir aidé au laboratoire LBCM à Vannes. Merci à Kévin pour m'avoir montré où étaient les portoirs, les milieux, le café ou encore les disquettes d'enregistrement (oui oui ça existe encore).

Un très grand merci à mes deux stagiaires, Laury et Florian sans qui je n'aurai pas tous ces résultats, merci pour leur motivation, leur patience et leur aide !

Je remercie également mes amis !!

Bien sûr comme promis (on se demande à qui ?!), et pour le cliché, je remercie Ecaille et Fafa, les seuls à être resté « veiller » aussi tard à mes côtés pendant toute cette période de rédaction !

Un grand merci à ceux qui m'ont accompagné durant ces trois ans, durant les hauts et les bas : à Delphine (encore !!), à David, à Bruno et Patricia avec qui je veux bien re-parier

(même si je dois encore perdre...). Je les remercie pour leur grande générosité. A Ben, merci d'avoir toujours cru en moi, et merci pour ton soutien permanent.

Merci à Valérie et Fabrice d'avoir été présent dès mon arrivée Place Gambetta ! Merci pour toutes vos attentions et votre soutien ! Le marathon est bien loin maintenant ma « Riri ».
Je remercie également toutes les danseuses et Marie-Do avec qui j'ai passé de très bons moments tout particulièrement en juin de chaque année, quel bonheur, cela me manque déjà !
Un énorme merci à Justine pour sa folie!! Merci à Gaétan d'être venue se perdre à la Tremblade pendant quelques jours. Merci à Marie, Laura, Solène, Thomas et William que je compte revoir très vite après la fin de cette aventure !

Merci à Fabienne, Philippe, Audrey et Anthony de m'avoir si bien accueillie, pour leur joie de vivre, les bons repas, les vacances à la mer ou au ski.... Oui oui au ski avec de la neige, des gens et des chutes! Merci aussi à Daniel, Solange et Marcel.

A ma grand-mère baroudeuse, une pensée à mon grand-père,
A Mamie Suzy

A mes parents qui ont toujours tant fait!

A mon frère, Emeline et ma petite Anaé, qui vont énormément me manquer durant ces trois prochaines années.

A mon petit Puma (oui j'ai beaucoup d'animaux à la maison) pour tout ton amour, tous tes conseils, tes encouragements ! Merci de me faire tant rire et de m'apporter chaque jour un peu plus.

« *Hypothèse: Souvent dangereuse, toujours hardie* »

Gustave Flaubert

Publications présentées dans le manuscrit :

1. **Segarra A**, Faury N, Pépin JF, Renault T (2014). Transcriptomic study of 39 ostreid herpesvirus 1 genes during an experimental infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 119, 5-11.
2. **Segarra A**, Baillon L, Faury N, Tourbiez D, Renault T. Detection and distribution of ostreid 1 herpesvirus 1 in experimentally infected Pacific oyster spat (soumis à *Virus Research*, Juin 2014)
3. **Segarra A**, Mauduit F, Dégremont L, Faury N, Haffner P, Pépin JF, Tourbiez D, Trancart S, Travers A, Renault T. Dual Transcriptomics of Virus-host interactions: comparing two Pacific oyster families presenting contrasted susceptibility to ostreid herpesvirus 1. *BMC Genomics*, 15(580), 1-13
4. **Segarra A** and Renault T. Viral infection and OsHV-1 RNA detection in larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (soumis à *Journal of Invertebrate Pathology*)
5. **Segarra A**, Baillon L, Tourbiez D, Benabdelmouna A, Faury N, Bourgougnon N, Renault T. Ostreid herpesvirus type 1 replication and host response in adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (*Veterinary Research*, accepté en septembre 2014)
6. **Segarra A**, Pauletto M, Quillien V, Renault T, Huvet A. *In vivo* RNAi induces a protective antiviral immune response in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, against subsequent challenge with ostreid herpesvirus 1 (en préparation)
7. Renault T and **Segarra A**, Viral cycle of ostreid herpesvirus 1 (en préparation)

Publications non présentées dans le manuscrit :

8. Renault T, Tchaleu G, Faury N, Moreau P, **Segarra A**, Barbosa-Solomieu V, Lapègue S (2014). Genotyping of a microsatellite locus to differentiate clinical Ostreid herpesvirus 1 specimens. *Veterinary Research*, 45(3), 1-8.
9. Renault T, Moreau P, Faury N, Pepin JF, **Segarra A**, Webb S (2012). Analysis of Clinical ostreid herpesvirus 1 (*Malacoherpesviridae*) Specimens by Sequencing Amplified Fragments from Three Virus Genome Areas. *Journal of Virology*, 86(10), 5942-5947.
10. Morga B, Arzul I, Faury N, **Segarra A**, Chollet B, Renault T (2011). Molecular responses of *Ostrea edulis* haemocytes to an *in vitro* infection with *Bonamia ostreae*. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(3), 323-333.
11. **Segarra A**, Pepin JF, Arzul I, Morga B, Faury N, Renault T (2010). Detection and description of a particular ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research*, 153(1), 92-99.

Communications orales :

Segarra A, Faury N, Haffner P, Moreau P, Pépin JF, Tourbiez D, Trancart S, Travers A, Bourgougnon N et Renault T. (2013). Expression de gènes viraux de l'herpèsvirus OsHV-1 chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, XV^e Journées Francophones de Virologie, 18 & 19 April 2013, Paris (France).

Segarra A, Faury N, Haffner P, Moreau P, Pépin JF, Tourbiez D, Trancart S, Travers A, Bourgougnon N et Renault T. (2013). Etude des interactions hôtes-virus chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* durant une infection expérimentale par OsHV-1, Journées conchyliques Ifremer, 23 au 25 January 2013, Roscoff (France).

Segarra A, Pepin JF, Morga B, Tourbiez D, Faury N, Arzul I, Renault T (2012). Viral gene expression during the infection with herpesvirus OsHV-1 μ Var in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Bivalife meeting: Controlling infectious diseases in oysters and mussels in Europe. 7 & 8 June 2012, Issy-les-moulineaux, (France).

Renault T, Arzul I, Chollet B, Faury N, François C, Garcia C, Haffner P, Joly J. P, Omnes E, Moreau P, Pepin J.F, Robert M, Saulnier D, Schikorski D, **Segarra A**, Tourbiez D (2010). Connaissances des agents infectieux : herpès virus et vibrions. Journées de restitution des résultats du projet « Surmortalité des huîtres creuses », 1^{er} & 2 Decembre 2010, Ifremer, Nantes (France).

Renault T, Allain G, Arzul I, Chollet B, Cobret L, De Decker S, Faury N, Ferrand S, Francois C, Garcia C, Haffner P, Joly JP, Miossec L, Morga B, Nicolas JL, Omnes Emmanuelle, Pepin JF, Saulnier D, Schikorski D and **Segarra A** (2009). Summer mortality outbreaks of French Pacific oysters *Crassostrea gigas* in 2008 and 2009. 14th EAFP International Conference, Diseases of Fish and Shellfish, 14 to 17 September 2009, Prague, (Czech Republic).

Pepin JF, **Segarra A**, Faury N, Morga B, Tourbiez D, Aubert M and Renault T (2009). Summer oyster mortalities in 2008 in France and characterization of a new genotype in isolates of ostreid herpesvirus. 14th EAFP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, 14 to 19 September 2009, Prague, (Czech Republic).

Morga B, Arzul I, **Segarra A**, Faury N, Chollet B, and Renault T (2009). Modulation of gene expression in haemocytes from *Ostrea edulis* in response to an infection by the parasite *Bonamia ostreae*. Oral communication in 101st Meeting National shellfish of America in Savannah, 22 to 26 March 2009, Georgia (USA)

Communications affichées:

Segarra A, Baillon L, Mauduit F, Faury N, Haffner P, Moreau P, Pépin JF, Tourbiez D, Trancart S, Travers A, Renault T (2013). *In Vivo* Transcriptomic Study Of 39 Viral Genes And 17 Host Genes In Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* Infected By Ostreid Herpesvirus 1: Comparing Two Oyster Families Presenting Different Levels Of Susceptibility, 5th European Congress of Virology, 11 to 14 September 2013, Lyon (France).

Segarra A, Baillon L, Mauduit F, Faury N, Haffner P, Moreau P, Pépin JF, Tourbiez D, Trancart S, Travers A, Renault T (2013). *In Vivo* Transcriptomic Study Of 39 Viral Genes And 17 Host Genes In Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* Infected By Ostreid Herpesvirus 1: Comparing Two Oyster Families Presenting Different Levels Of Susceptibility, 16th EAFP

International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, 2 to 6 September 2013, Tampere (Finland).

Segarra A, Faury N, Haffner P, Moreau P, Pépin JF, Tourbiez D, Trancart S, Travers A, Renault T (2012). Expression de gènes viraux de l'herpèsvirus OsHV-1 sous sa forme μ Var chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, XIV^e Journées Francophones de Virologie, 29 & 30 March 2012, Paris (France).

Renault T, Moreau P, Pepin JF, Faury N, **Segarra A** and Webb S. (2012). Diversité de l'ostreid herpesvirus 1: étude de 3 régions du génome viral, Journées Francophones de Virologie, 29 & 30 March 2012, Paris (France).

Table des matières

LISTE DES FIGURES	1
LISTE DES TABLEAUX	3
SIGLES ET ABREVIATIONS	4
INTRODUCTION	7
ETAT DE L'ART	13
I. LA STAR PARMIS LES MOLLUSQUES MARINS	15
I.1 BIOLOGIE DE L'HUITRE CREUSE, <i>CRASSOSTREA GIGAS</i>	15
I.2 PRODUCTION ET CONTEXTE HISTORIQUE	18
II. MORTALITES MASSIVES CHEZ L'HUITRE CREUSE, <i>CRASSOSTREA GIGAS</i>	19
II.1 MORTALITES ET STADES DE DEVELOPPEMENT	19
II.2 FACTEURS DE RISQUE	22
II.3 MOYENS DE LUTTE CONTRE LES MALADIES INFECTIEUSES	27
III. OSHV-1 : UN MEMBRE DE LA GRANDE FAMILLE DES HERPESVIRUS	31
III.1 STRUCTURE	31
III.2 GENOME	32
III.3 CLASSIFICATION	37
III.4 LE VIRUS ET SON HOTE	39
III.5 DIVERSITE CHEZ OSHV-1	47
III.6 REPARTITION GEOGRAPHIQUE	48
IV. MECANISMES DE DEFENSE CHEZ L'HUITRE CREUSE, <i>CRASSOSTREA GIGAS</i>	49
IV.1 LA REPONSE IMMUNITAIRE INNEE	50
IV.2 REPONSE IMMUNITAIRE ADAPTATIVE CHEZ <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> ?	56
V. ORGANISATION DU MANUSCRIT	57
CHAPITRE 1 : RECHERCHE D'ARNM VIRAUX : DETECTION ET LOCALISATION	60
I. EST-IL POSSIBLE DE DETECTER DES ARNM VIRAUX AU TRAVERS D'UNE APPROCHE DE PCR EN TEMPS REEL ?	62
I.1 RECHERCHE <i>IN VIVO</i> D'ARN VIRAUX CHEZ DES HUITRES CREUSES <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> , AU STADE JUVENILE	62
ARTICLE 1	64
I.2 RECHERCHE <i>IN VITRO</i> D'ARN VIRAUX DANS DES PRIMO-CULTURES DE CELLULES CARDIAQUES D'HUITRE CREUSE, <i>CRASSOSTREA GIGAS</i>	91
II. EST-IL POSSIBLE DE DETECTER ET LOCALISER DES ARNM VIRAUX AU TRAVERS D'UNE APPROCHE D'HYBRIDATION <i>IN SITU</i> CHEZ LE NAISSAIN D'HUITRE CREUSE?	98
ARTICLE 2	99
III. CONCLUSION DU CHAPITRE 1	122

CHAPITRE 2 SENSIBILITES CONTRASTEES A L'INFECTION PAR OSHV-1 : INTERACTIONS <i>IN VIVO</i> ENTRE L'HUITRE CREUSE, <i>CRASSOSTREA GIGAS</i>, ET LE VIRUS EN CONDITIONS EXPERIMENTALES	126
I. EST-IL POSSIBLE DE METTRE EN EVIDENCE DES DIFFERENCES TRANSCRIPTOMIQUES DE GENES VIRAUX ET CELLULAIRES CHEZ DES FAMILLES D'HUITRES CREUSES AU STADE NAISSAIN?	129
ARTICLE 3	131
II. EST-IL POSSIBLE DE DETECTER UNE EXCRETION DIFFERENTIELLE D'ADN VIRAL LORS D'UNE INFECTION EXPERIMENTALE CHEZ DES ANIAMUX APPARTENANT A DEUX FAMILLES D'HUITRES CREUSES (RESULTATS COMPLEMENTAIRES) ?	144
III. EXISTE-IL DES DIFFERENCES DE SENSIBILITE A L'INFECTION OSHV-1 AU STADE LARVAIRE ?	150
ARTICLE 4	152
IV. CONCLUSION DU CHAPITRE 2	165
CHAPITRE 3 : MODULATION DE LA SENSIBILITE DES HUITRES CREUSES A L'INFECTION VIRALE PAR UNE APPROCHE D'ARN INTERFERENCE	170
I. EST-IL POSSIBLE DE MODULER LA SENSIBILITE CHEZ DES HUITRES CREUSES, <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> , FACE AU VIRUS OSHV-1 ?	171
I.1 INTRODUCTION	171
I.2 MATERIEL ET METHODES	172
I.3 RESULTATS	178
I.4 DISCUSSION	184
II. CONCLUSION DU CHAPITRE 3	190
CHAPITRE 4: INFECTION VIRALE EN CONDITIONS EXPERIMENTALES ET L'HUITRE CREUSE, <i>CRASSOSTREA GIGAS</i>, AU STADE ADULTE	194
I. L'HUITRE CREUSE, EST-ELLE RESISTANTE A L'INFECTION AU STADE ADULTE ?	195
ARTICLE 5	198
II. CONCLUSION DU CHAPITRE 4	219
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	222
I. DETECTION ET LOCALISATION D'ARNM D'OSHV-1 CHEZ <i>C. GIGAS</i>	223
II. INTERACTIONS ENTRE OSHV-1 ET L'HUITRE CREUSE, A DIFFERENTS STADES ET PRESENTANT DIFFERENTES SENSIBILITES A L'INFECTION VIRALE	225
II.1 UNE REPLICATION VIRALE COUTE QUE COUTE ?	227
II.2 LE ROLE DE LA REPOSE IMMUNITAIRE ?	230
II.3 UNE CERTAINE MEMOIRE POUR MIEUX SE DEFENDRE?	232
II.4 DES ANIMAUX RESERVOIRS DU VIRUS : LATENCE/PERSISTANCE DU VIRUS ?	233
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	238
ANNEXES	256

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Schéma de la triade épidémiologique d'après Snieszko(1974).	8
Figure 2 : Biologie générale de l'huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i>	14
Figure 3 : Production de l'huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i>	17
Figure 4 : Exemple de trois agents pathogènes pour l'huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i>	24
Figure 5: Structure d'une particule de type herpèsvirus	30
Figure 6: Reconstruction microscopique par cry-electron de la capside du virus OsHV-1 (Davison <i>et al.</i> , 2005)..	30
Figure 7: Organisation génomique des Herpesviridae par (Roizman et Pellett, 2001).....	32
Figure 8: Structure du génome et distribution des gènes viraux d'OsHV-1 (modifié d'après Davison <i>et al.</i> , 2005).....	34
Figure 9: Représentation schématique de la répartition des 124 ORFs du virus OsHV-1 selon 5 groupes	36
Figure 10: Dendrogramme concaténé à partir de la séquence d'ADN polymérase de 34 herpèsvirus (modifié d'après Savin <i>et al.</i> , 2010).....	37
Figure 11: Cycle de réplication hypothétique d'OsHV-1 (Renault et Segarra in prép.)	39
Figure 12: Schéma d'entrée du HCMV dans une cellule (Compton, 2004).....	41
Figure 13: Expression des gènes très précoces (α), précoces (β), et tardifs (γ) chez le virus Herpès Simplex (d'après Roizman et Knipe, 2001).....	42
Figure 14: Schéma du cycle viral des <i>Herpesviridae</i> (d'après Renault <i>et al.</i> , 1997)	45
Figure 15: Répartition mondiale d'OsHV-1 et ses variants (d'après OIE, 2014)..	48
Figure 16: Voie de signalisation cellulaire régulant l'apoptose.....	51
Figure 17: Modulation de la voie apoptotique par le virus HSV-1 (modifié d'après Nguyen and Blaho, 2009).....	51
Figure 18: Primo-cultures de cellules cardiaques <i>C. gigas</i> à 24 hpi pour l'essai 1, par microscopie photonique..	94
Figure 19: Mortalité cumulée et quantité d'ADN viral détectée dans l'eau de mer pour les familles A et P	145
Figure 20: Quantité d'ADN viral détectée dans l'eau de mer pour la famille P.	147
Figure 21: Schéma simplifié de l'expression des gènes cellulaires étudiés chez la famille sensible et moins sensible à 26 hpi	166
Figure 22: Plan expérimental d'injection des ARNdb et de l'infection par OsHV-1 chez du naissain de <i>Crassostrea gigas</i>	174
Figure 23: Courbe de survie chez le naissain d'huître, <i>Crassostrea gigas</i> , avec ou sans injection d'ARNdb Ikb2 et infecté ou non avec une suspension d'OsHV-1	178
Figure 24: Quantité d'ADN viral détecté chez les huîtres creuses avec ou sans injection d'ARNdb à 24 et 48 heures post infection du virus OsHV-1.....	179
Figure 25: Niveau d'expression de 39 gènes d'OsHV-1 à 24 et 48 hpi chez (a) des individus ayant reçu du Tris-NaCl seul et (b) ceux ayant reçu des ARNdb Ikb2.....	180

Figure 26: Moyenne de l'expression des gènes viraux regroupée en clusters en fonction des conditions Tris-NaCl+OsHv-1 et ARNdb+OsHV-1	181
Figure 27: Expression relative de cinq gènes cellulaires par PCR en temps réel 24 et 48 hpi	183
Figure 28: Schéma récapitulatif de l'expression des gènes cellulaires chez <i>Crassostrea gigas</i> à 26 hpi, suite à une injection d'ARNdb	186
Figure 29: Pourcentage de survie des huîtres creuses avec ou sans injection d'ARNdb suivi d'une infection par OsHV-1	187
Figure 30: Quantité d'ADN viral détecté par PCR en temps réel chez les huîtres creuses à différentes conditions.....	188
Figure 31: Bilan du niveau d'expression des gènes viraux en fonction du matériel biologique.....	227
Figure 32: Schéma hypothétique des différentes étapes d'infection d'OsHV-1 en milieu nature.....	235
Figure 33: Bilan de la thèse : principaux résultats et perspectives.....	236

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Récapitulatif des différentes caractéristiques des herpèsvirus humains et de l'huître creuse	29
Tableau II : Essais d'infections expérimentales <i>in vitro</i> sur des primo-cultures de cellules cardiaques	94
Tableau III: Détection d'ARN viral par PCR en temps réel dans des primo-cultures de cellules cardiaques à différents temps et conditions (exemple de l'essai 1). Les Cycles seuils (Cts) sont les données brutes obtenus par PCR en temps réel.	97
Tableau IV: Bilan des individus détectés positifs pour les 39 ORFs viraux en fonction du matériel biologique (%). Pour chaque matériel biologique, le pourcentage a été obtenu à partir du temps (hpi) pour lequel la quantité d'ADN viral était la plus élevée.	228

SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

dNTP: désoxyNucléotides Tri-Phosphate

EBV : Epstein Barr Virus

EM: Eau de Mer

EMS: Eau de Mer Strérisée

FAO: Food and Agriculture Organization

GFP: Green Fluorescent Protein

IFI44: InterFeron-Induced protein 44

IFN: InterFéron

Ifremer: Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

I κ B2: Inhibitor of kappa Beta 2

IRF: Interferon Regulatory Factor

HCMV: Human CytoMegaVirus

HIS: Hybridation *In Situ*

HSPG: Heparan Sulfate ProteoGlycan

HSV: Herpes Simplex Virus

LAT: Latency Associated Transcript

LGPM: Laboratoire Génétique et Pathologique des Mollusques Marins

MET: Microscopie Electronique à Transmission

MyD88: Myeloid Differentiation primary response gene 88

NF- κ B: Nuclear Factor kappa B

ORF: Open Reading Frame

OsHV-1: Ostreid HerpesVirus type 1

PCR: Polymerase Chain Reaction

PMA: Phorbol Myristate Acetate

PRPs: Pathogen Recognition Proteins

ProPO: pro-phénoloxydase/phénoloxydase

RT: Reverse Transcription

TLR: Toll Like Receptor

Tris-NaCl: Tris(hydroxyméthyl)aminométhane-chlorure de sodium

UV: Ultra-Violet

VZV: Varicella-Zoster Virus

INTRODUCTION



L'ostréiculture française repose essentiellement sur la production d'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Ce mollusque bivalve, est l'espèce aquacole la plus commercialisée dans le monde. *C. gigas* est produite principalement en Chine, au Japon, en Corée et en France (FAO, 2010.). La France étant le premier producteur en Europe.

Depuis l'introduction de l'huître creuse dans différents pays du monde, comme en France, des phénomènes de mortalités sont observés chez *C. gigas*, affectant jusqu'à 50 % de la population. Ces mortalités semblent être liées à des infections virales et/ou bactériennes. Le déclenchement de maladie infectieuse chez l'hôte résulte des interactions conduisant à un déséquilibre entre les différents acteurs de la triade hôte/agent pathogène/environnement (**Figure 1**, p8) (Snieszko, 1974). Ces causes de déséquilibre semblent donc être multifactorielles.

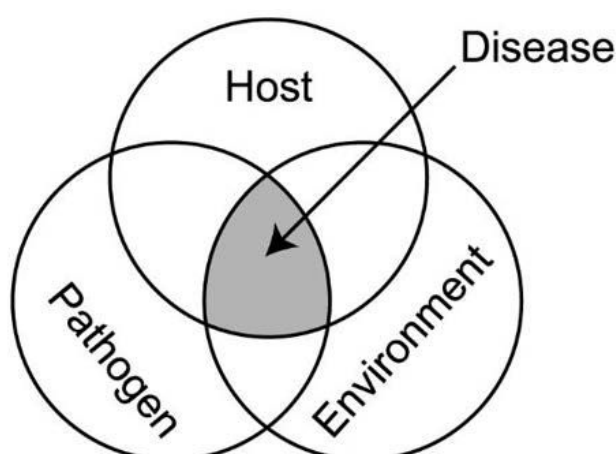


Figure 1: Schéma de la triade épidémiologique d'après Snieszko (1974).

Le virus ostreid herpesvirus type 1 (OsHV-1) peut être considéré comme un de ces agents infectieux majeur affectant les élevages d'huîtres creuses, *C. gigas*, en France. Des épisodes de mortalité massive causés par ce virus sont régulièrement rapportés chez les jeunes animaux (naissains et juvéniles). Cependant, OsHV-1 a pu également être détecté chez des huîtres adultes en absence de mortalité (Arzul *et al.*, 2002).

Depuis 2008, ces épisodes ont affecté le naissain d'huître creuse dans l'ensemble des régions de production françaises et provoqué des pertes économiques considérables (EFSA, 2010). De

plus, des différences de sensibilité à l'infection ont été observées au sein de l'espèce *C. gigas*. Des travaux antérieurs suggèrent une base génétique de la survie des animaux face à cette infection (Dégremont, 2011; Sauvage *et al.*, 2009). Ifremer a mis en place un programme de sélection génétique réalisée à partir d'animaux présentant un meilleur taux de survie suite à des infections expérimentales. Le développement d'animaux « résistant » ou moins sensibles a ouvert des nouvelles perspectives d'études, liées notamment aux mécanismes cellulaires et moléculaires de défense. Un certain nombre de travaux a déjà été réalisé dans cet optique (Fleury et Huvet, 2012; Huvet *et al.*, 2004; Normand *et al.*, 2014; Renault *et al.*, 2011; Sauvage *et al.*, 2010). L'étude de ces mécanismes cellulaires a récemment été rendue plus accessible par le séquençage complet du génôme de l'huître creuse, *C. gigas* (Zhang *et al.*, 2012).

En parallèle, bien que le génome d'OsHV-1 ait été séquencé depuis bientôt dix ans (Davison *et al.*, 2005), et classé dans la famille *Malacoherpesviridae*, très peu d'études sont disponibles sur son cycle de réplication ou sur l'expression de ses gènes (Burge et Friedman, 2012; Renault *et al.*, 2011). Ce manque d'information peut être expliqué notamment par l'éloignement phylogénique par rapport aux herpesvirus de vertébrés et par l'absence de lignées cellulaires de mollusques marins. De plus, 65% des gènes viraux codent pour des protéines de fonction inconnue. Néanmoins, depuis 2008, une méthode d'infection expérimentale a été développée par l'Ifremer (Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer) rendant possible le maintien d'une source virale infectieuse. Des outils de biologie moléculaire ont aussi été élaborés facilitant la détection du virus ou de certains de ses constituants.

Dans ce contexte, la principale problématique du travail de thèse vise à mieux comprendre les interactions entre l'huître creuse et OsHV-1, et plus particulièrement durant une cinétique d'infection. Une connaissance plus fine du virus, et des bases moléculaires des interactions sont indispensables à la compréhension des mécanismes infectieux. Ainsi, l'apport de ces nouveaux éléments a pour perspectives de mieux connaître le cycle de réplication du virus et les réponses immunitaires de l'hôte. Dans le futur, ceci pourrait permettre de limiter les fortes mortalités, en adaptant les techniques d'élevage et, en développant des méthodes prophylactiques.

Le manuscrit est organisé en quatre chapitres et chaque chapitre répond à un ou plusieurs objectifs en particulier :

- 1) L'objectif du chapitre 1 était de détecter et localiser des ARNm du virus OsHV-1 au cours de l'infection chez l'huître creuse, *C. gigas*. Ainsi, nous avons choisi l'approche par PCR en temps réel. Cette approche nous a permis de travailler en individuel et de suivre la cinétique d'infection du virus. Nous avons également choisi de suivre 39 gènes parmi les 124 que code le génome viral. Le but étant de sélectionner le plus grand nombre de gènes d'intérêts sur la base des annotations du génome d'OsHV-1. La localisation des ARN viraux a quant à elle été abordée par hybridation *in situ*.
- 2) Le chapitre 2 avait pour objectifs d'identifier et caractériser les différences transcriptomiques de gènes viraux et cellulaires chez des individus présentant des sensibilités contrastées à l'infection à OsHV-1. Pour se faire, des familles d'huîtres creuses génétiquement différentes ont été sélectionnées. Une comparaison du transcriptome du virus OsHV-1 a été réalisée aux stades naissain et larvaire, en utilisant des familles d'huîtres génétiquement différentes.
- 3) Le troisième objectif était de moduler la sensibilité des huîtres et caractériser les différences transcriptomiques de gènes viraux et cellulaires ; nous avons modifié la sensibilité des huîtres à l'infection virale par une approche d'ARN interférant. Le but était d'étudier le gène cellulaire Ikb2 potentiellement impliqué dans la « résistance » à l'infection virale, puis de comparer l'expression des gènes viraux et de certains gènes cellulaires chez les individus traités ou non par les ARNs double brin.
- 4) Enfin, le dernier objectif était d'identifier des activités antivirales et étudier le transcriptome d'OsHV-1 et de l'huître creuse au cours d'une infection au stade adulte. L'intérêt d'étudier les interactions hôte/virus chez l'adulte réside dans l'absence de mortalité associée à la détection d'OsHV-1 rapportée sur le terrain, contrairement aux autres stades de développement. L'activité antivirale de l'hémolymph de huîtres creuses adultes a été testée vis-à-vis d'un herpesvirus humain, HSV-1, en utilisant des cellules Véro. Nous avons choisi d'utiliser ce modèle hétérologue, en raison du

manque de lignées cellulaires de mollusques marins. De plus, des activités anti HSV-1 ont été détectées plus particulièrement pendant l'été dans hémolymphe des mollusques marins vis-à-vis de différents virus (Dang *et al.*, 2011; Olicard *et al.*, 2005a, 2005b).

ETAT DE L'ART

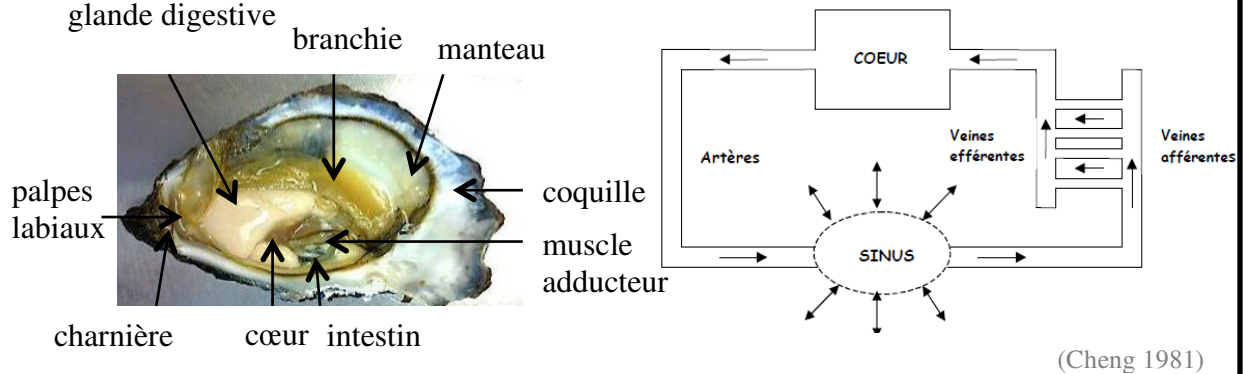


Segarra A.

A. Classification de l'huître creuse du Pacifique

Règne :	Animal, Invertébrés
Embranchement :	Mollusques
Classe :	Lamellibranches (Bivalvia)
Ordre :	Filibranchia
Sous-Ordre :	Anisomyaria
Super-Famille :	Ostreoidea
Famille :	Ostreidae
Genre :	<i>Crassostrea</i>
Espèce :	<i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1793)

B. Anatomie de l'huître *Crassostrea gigas* adulte mature et système circulatoire



C. Cycle de vie de *Crassostrea gigas*

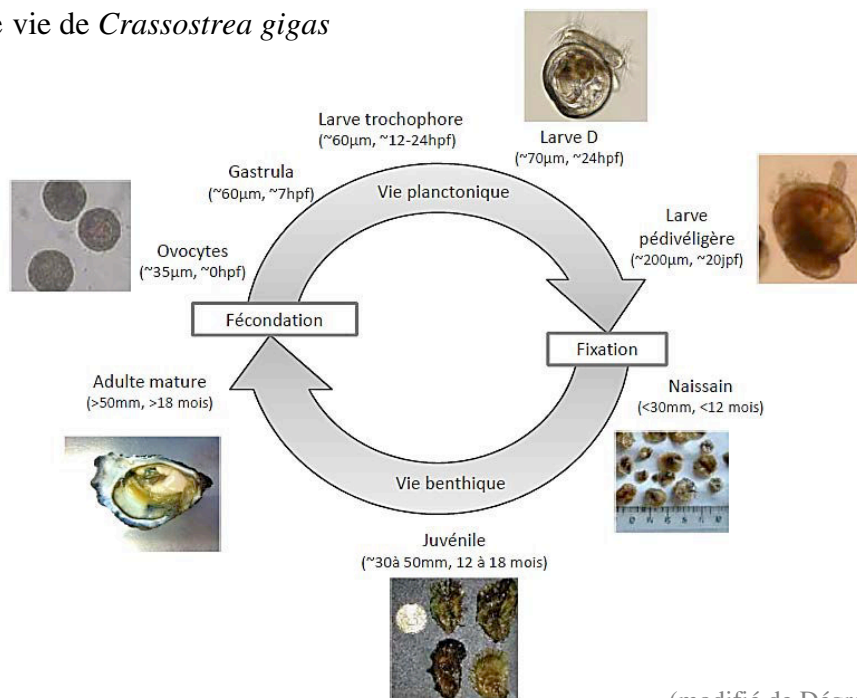


Figure 2 : Biologie générale de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*

I. La star parmi les mollusques marins

I.1 Biologie de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*

I.1.A. Classification

Les huîtres de l'espèce *C. gigas*, originaires du Nord-Ouest du Pacifique, sont des métazoaires protostomiens classés parmi les mollusques bivalves. *Crassostrea gigas* appartient à la classe des Lamellibranches, à l'ordre des Filibranches, au sous-ordre des Anisomyaires, à la superfamille des Ostréoidés et à la famille des Ostréidés caractérisée par une coquille à valve gauche plus profonde que la droite (**Figure 2.A**, p14). Le genre *Crassostrea* comprend notamment les espèces *C. gigas*, *C. angulata* (huître portugaise) et *C. virginica* (huître américaine). Le nom usuel de *C. gigas* est l'huître japonaise ou huître creuse du Pacifique. Cependant la classification des mollusques est très complexe et sujette à controverses. Elle repose sur des critères anatomiques, auxquels s'ajoute la distribution géographique. La plasticité morphologique de ces animaux (forme et couleur de la coquille par exemple) complique également la classification.

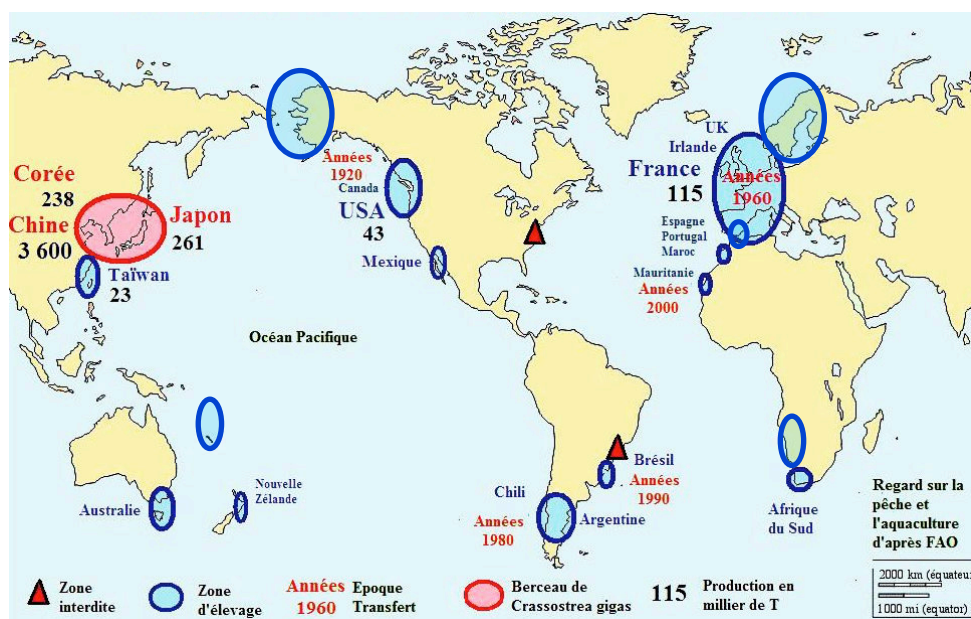
I.1.B. Anatomie et système circulatoire

L'huître creuse, *C. gigas*, est constituée d'un corps mou, protégé par une coquille à deux valves asymétriques (**Figure 2.B**, p14). Les valves sont reliées par la charnière et par le muscle adducteur. La coquille est sécrétée par la face extérieure et le bord libre du manteau. Ce dernier joue également un rôle sensoriel. La coquille se compose de trois couches : i) la couche la plus externe ou *periostracum*, fine et cornée; ii) la couche intermédiaire constituée de nature protéique (conchyoline); iii) la couche nacrée constituée de cristaux d'aragonite. La masse céphalique est absente, elle est représentée par les palpes labiaux, assurant le tri des particules, et la bouche. L'huître possède une paire de branchies lamellaires qui s'étendent de l'anus à la bouche. Ces dernières assurent les fonctions de respiration, de nutrition et à l'excrétion de certains déchets. On observe également des vaisseaux afférents et efférents, des muscles et des faisceaux nerveux. L'huître ne possédant pas d'hémocyanine ou d'hémoglobine, l'oxygène est transporté, dissous dans l'hémolymphe, passe par le cœur et des branchies vers

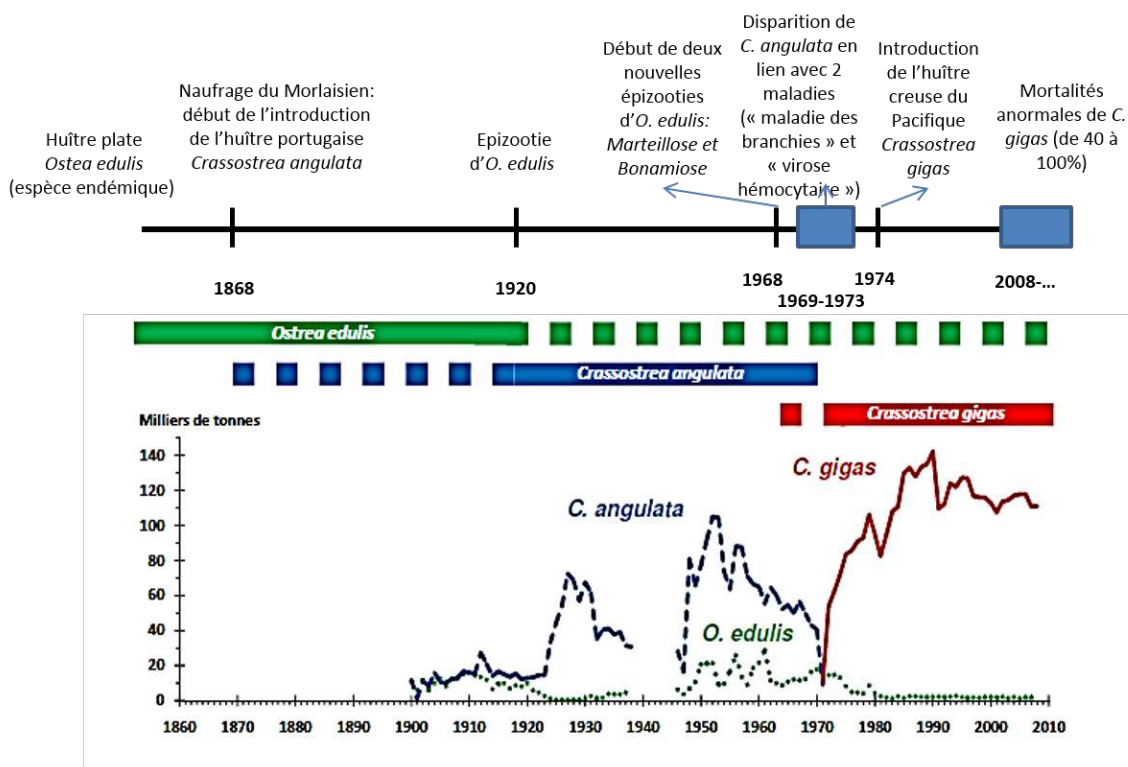
les organes. Le cœur est composé d'un ventricule et de deux oreillettes. L'ensemble de l'organe est soutenu par une enveloppe de tissu conjonctif. Le ventricule propulse l'hémolymphe, le fluide incolore circulant, dans les vaisseaux, mais celui-ci peut également s'insinuer librement au sein de tous les tissus. Le système circulatoire de l'huître est ainsi qualifié de semi-ouvert (Cheng, 1981). Enfin, la gonade assure la reproduction. Elle se développe dans le tissu entourant la glande digestive.

I.1.A. Cycle de vie et reproduction

Chez l'huître creuse, l'hermaphrodisme successif est dit protandrique (mâle la première année, puis changement de sexe) (Buroker, 1983). La gamétogenèse débute au printemps lorsque les conditions environnementales sont favorables. La maturation et l'émission des gamètes sont atteintes durant l'été uniquement si un seuil de température dit « température critique de ponte » est dépassé. Les gamètes des deux sexes sont expulsés dans l'eau, la fécondation est donc externe. Un individu peut émettre plusieurs dizaines de millions de gamètes. Le développement passe par une phase larvaire planctonique. Après la fécondation, le développement embryonnaire a été largement étudié chez l'huître creuse (Gerard *et al.*, 1995). Les divisions cellulaires sont rapides et aboutissent à la formation d'un embryon de type morula, gastrula, puis trochophore pour donner 24 heures après fécondation une larve véligère en forme de D. Lorsque la larve atteint une taille d'environ 200µm, elle développe un pied participant à la recherche d'un substrat pour sa fixation et porte le nom de larve pédivéligère. Une fois fixée, la larve devient naissain et débute sa métamorphose liée à de nombreuses modifications notamment l'apparition du manteau et des branchies. A partir de 12 mois, elle est considérée comme juvénile, et après 18 mois le terme d'adulte est utilisé (**Figure 2.C**, p14). Elle passera le reste de sa vie fixée au substrat sans autre modification qu'une augmentation de taille. Celle-ci atteint une taille commerciale dès 40 grammes.

A. Principaux pays producteurs de *C. gigas*B. Production française de *C. gigas* et contexte

(FAO, 2010)



(modifié d'après Bernard, 2011)

Figure 3 : Production de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*

I.1.B. Cycle de vie et reproduction

Chez l'huître creuse, l'hermaphrodisme successif est dit protandrique (mâle la première année, puis changement de sexe) (Buroker, 1983). La gamétogenèse débute au printemps lorsque les conditions environnementales sont favorables. La maturation et l'émission des gamètes sont atteintes durant l'été uniquement si un seuil de température dit « température critique de ponte » est dépassé. Les gamètes des deux sexes sont expulsés dans l'eau, la fécondation est donc externe. Un individu peut émettre plusieurs dizaines de millions de gamètes. Le développement passe par une phase larvaire planctonique (**Figure 2.C**, p14). Après la fécondation, le développement embryonnaire a été largement étudié chez l'huître creuse (Gerard *et al.*, 1995). Les divisions cellulaires sont rapides et aboutissent à la formation d'un embryon de type morula, gastrula, puis trochophore pour donner 24 heures après fécondation une larve véligère en forme de D. Lorsque la larve atteint une taille d'environ 200µm, elle développe un pied participant à la recherche d'un substrat pour sa fixation et porte le nom de larve pédivéligère. Une fois fixée, la larve devient naissain et débute sa métamorphose liée à de nombreuses modifications notamment l'apparition du manteau et des branchies. A partir de 12 mois, elle est considérée comme juvénile, et après 18 mois le terme d'adulte est utilisé (**Figure 2.C**, p14). Elle passera le reste de sa vie fixée au substrat sans autre modification qu'une augmentation de taille. Celle-ci atteint une taille commerciale dès 40 grammes.

I.2 Production et contexte historique

La répartition géographique naturelle de *C. gigas* s'étend de l'Asie du Nord Est, à l'Europe depuis le Portugal à la Norvège et en Amérique du Nord jusqu'au Sud-Est de l'Alaska. Mais, elle est également présente en Afrique, dans la région Australo-Pacifique et en Amérique du Sud (**Figure 3.A**, p17) (FAO). En 2012, la production globale de cette espèce était estimée à 608 688 de tonnes (Mt) pour une valeur marchande d'environ 1,3 milliards de dollars (données FAO, <ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/a-6.pdf>). Cela représente la production la plus importante en tonnage devant celles des poissons ou des crustacés. L'huître creuse, *C. gigas*, a été introduite en France à la fin des années 60 et le début des années 70 (Grizel et Héral, 1991), consécutivement à la disparition de l'huître portugaise, *C. angulata*. Ces mortalités sont attribuées à des syndromes présumés d'origine virale (virus de type iridovirus)

plus connus sous le nom de maladie des branchies et maladie hémocytaire (Comps *et al.*, 1976) (**Figure 3.B**, p17). Depuis cette époque, l'huître du Pacifique est l'espèce dominante en France qui occupe aujourd'hui le quatrième rang mondial. Cependant, cette production est également affectée par des mortalités massives au stade naissain.

II. Mortalités massives chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*

II.1 Mortalités et stades de développement

II.1.A. Au stade larvaire

Au cours de l'été 1991, les mortalités massives associées avec la détection d'un virus de type herpès ont été signalées chez des larves d'écloserie française (Nicolas *et al.*, 1992). A la même période, Hine et coll. (1992) ont décrit une infection de type herpétique associée à la mortalité de larves d'huîtres creuses dans des écloseries en Nouvelle-Zélande. Durant l'été 1992 et 1993, des mortalités élevées (90-100%) ont été observées parmi les lots de larves *C. gigas* dans plusieurs écloseries françaises. La réduction de l'alimentation et de l'activité de nage ont été observées trois à quatre jours après la fécondation. Les premières mortalités signalées à partir du sixième jour atteignent 100% de mortalité huit à dix jours après fécondation dans la plupart des lots. La présence de particules virales de type herpèsvirus chez les larves atteintes a été montrée par microscope électronique à transmission (Renault *et al.*, 1994b). Des bactéries appartenant au genre *Vibrio* ont également été observées durant des épisodes de mortalités larvaires chez *C. gigas* au Japon (*Vibrio splendidus*), en France (*V. coralliilyticus*) et aux Etats-Unis et en Angleterre (*V. tubiashii*) (EAFP 2014).

II.1.B. Aux stades naissain et juvénile

Des épisodes de mortalité massive (80 à 90%) ont été signalés sur la côte atlantique française au cours de l'été 1993, chez des huîtres âgées de trois à sept mois. Ces mortalités étaient associés à de fortes températures de l'eau et à la détection d'un virus de type herpès (Renault

et al., 1994b). Des observations réalisées en microscopie électronique à transmission ont montré la présence de particules virales de type herpès dans les tissus conjonctifs notamment les branchies et le manteau d'huîtres moribondes (Renault *et al.*, 1994b). Suite à cette première description, des mortalités ont été ensuite rapportées régulièrement en période estivale affectant des animaux de moins d'un an (naissain). Le virus détecté lors de ces mortalités a été identifié comme étant un herpèsvirus et appelé ostreid herpèsvirus 1 (OsHV-1) (Davison *et al.*, 2005; Le Deuff et Renault, 1999). Une corrélation a pu être démontrée entre la détection d'OsHV-1 par PCR et la mortalité chez le naissain d'huîtres creuses français et ce pour des lots analysés entre 1992 et 1997 (Renault *et al.*, 2000b). Par la suite, ce lien de causalité (entre les épisodes de mortalité au stade naissain et la détection du virus OsHV-1) a également été prouvé au travers d'une surveillance épidémiologique de 1997 à 2006 dans le cadre du réseau français Repamo (Réseau de pathologie des mollusques marin : réseau national réalisant la surveillance de la santé des mollusques pour le compte du ministère chargé de l'agriculture) (Garcia *et al.*, 2011; Renault, 2010; Renault, 2007). Ces mortalités affectent également d'autres pays. En Californie, OsHV-1 a été détecté par PCR chez le naissain pendant des épisodes de mortalités massives (Burge *et al.*, 2007, 2006; Friedman *et al.*, 2005). En 2002, l'île de Jersey comptait un taux élevé de mortalité (environ 90%) (EFSA, 2010).

A partir de 2008, le phénomène a pris une ampleur manifeste. L'importance des taux de mortalité, la rapidité et la quasi-simultanéité du phénomène sur les côtes françaises ont caractérisés ces mortalités. Les mortalités (entre 40 et 100 %), touchent tous les bassins de production y compris dans différents États Membres de l'Union Européenne (UE). Le naissain et les juvéniles semblent être les stades spécifiquement touchés par ces mortalités. L'huître creuse semble être la seule espèce de mollusques affectés par ces mortalités. Très vite, la piste infectieuse a été privilégiée, avec l'hypothèse de l'émergence d'une forme particulière du virus OsHV-1. Des échantillons provenant de différents États Membres ont été prélevés et testés afin de rechercher des agents pathogènes. Les résultats des tests de diagnostic en France et des autres États Membres ont indiqué (i) que des bactéries appartenant au genre *Vibrio sp* (*V. aesturianus* et *V. harveyi*) étaient également détectées dans les huîtres touchées, (ii) qu'il n'y avait pas d'agent pathogène à déclaration obligatoire en cause, (iii) qu'OsHV-1 était détecté dans la plupart des échantillons, particulièrement dans les huîtres moribondes, et (iv) que des particules virales de type herpèsvirus étaient observées par microscopie électronique à transmission dans les huîtres moribondes.

De plus, les épisodes de mortalité ont également été associés à la détection d'un génotype particulier du virus OsHV-1, appelé μ Var (Segarra *et al.*, 2010; **Annexe 1**, p257). Deux zones du génome du variant μ Var (régions des ORF 4 et ORF 43) présentent des différences par rapport à la forme de référence du virus (n° d'accession GenBank AY509523, virus purifié à partir de larves d'huître creuse collectées en France en 1995), notamment une délétion de 12 paires de bases dans une zone microsatellite située en amont de l'ORF 4 (Segarra *et al.*, 2010). En France, bien que ces deux génotypes (GenBank n° AY509523 et μ Var) aient été détectés de manière équivalente en 2008, le variant μ Var a été majoritairement détectée les années suivantes. Ces résultats soulèvent des questions sur l'émergence et la virulence du génotype μ Var. En 2010, la détection d'ADN viral du variant μ Var a également été signalée en l'absence de mortalité, aux Pays-Bas et en Italie chez *C. gigas* (EFSA, 2010).

II.1.C. Au stade adulte

Le terme de « mortalités estivales » a été utilisé initialement pour décrire les mortalités des huîtres creuses adultes pendant les mois les plus chauds de l'année. Ces mortalités ont été observées dans différentes régions du globe. Elles sont décrites au Japon et aux Etats-Unis depuis 1950 et en France depuis le milieu des années 1980 (Beattie *et al.*, 1980; Imai *et al.*, 1965; Maurer *et al.*, 1986), affectant le Bassin d'Arcachon (Maurer *et al.*, 1986), de Marennes-Oléron (Bodoy *et al.*, 1990), la Bretagne et la Normandie (Costil *et al.*, 2005; Fleury *et al.*, 2001; Goulletquer *et al.*, 1998). Ces dernières touchent plus de 30% de la production d'huître creuse, principalement les huîtres dont les gonades sont en maturation ou matures. L'augmentation de la température induit la prolifération et la sur-maturation des gonades. Le stress physiologique lié à cette maturation peut être associé à des événements de mortalité, mais d'autres facteurs sont probablement impliqués. Cependant, la cause de ces mortalités estivales chez *C. gigas* reste incertaine. En France, *V. aesturianus* et *V. splendidus* ont été rapportés au cours d'épisodes de mortalités chez l'adulte *C. gigas* (Garnier *et al.*, 2007). Des études suggèrent une étiologie complexe (Dégremont *et al.*, 2005; Samain *et al.*, 2007; Soletchnik *et al.*, 2007) et une cause multifactorielle. Le projet MOREST (Samain and McCombie, 2008), a conduit à l'élaboration d'un modèle d'interaction pour expliquer et identifier les facteurs de risque liés aux mortalités estivales. Les facteurs identifiés correspondaient à : (i) la température (au-dessus de 19 °C), (ii) au développement gonadique

(près de la ponte et le ratio gonadique/somatique élevé), (iii) la prédisposition génétique et (iv) au stress (incluant certains agents pathogènes tels que *Vibrio spp*, stress chimique ou thermique, changement de salinité).

Contrairement aux autres stades de développement, aucune mortalité associée avec la détection du virus OsHV-1 n'a été rapportée sur le terrain au stade adulte.

II.2 Facteurs de risque

Concernant les épisodes de mortalité massive d'huîtres creuses, les facteurs de risque sont multiples : changements climatiques, variations de la température, de la salinité, de la quantité d'O₂ dissous, de la turbidité, compétition pour l'espace, nourriture, base génétique, pratiques d'élevage en aquaculture (transport, manutention, surexploitation), perturbations de l'habitat, pollution ou encore maladies infectieuses.

II.2.A. Les risques liées à l'environnement

Si les facteurs liés à l'environnement sont multiples, deux d'entre eux, la température et les apports d'eau douce, ont été choisis ici du fait de leur importance et de la littérature existante. Le projet RISCO (2010-2013) mené en partenariat entre secteur professionnel (CRC-Bretagne Sud, CER-France-56) et organismes de recherche (Ifremer, Université de Bretagne Sud, Université de Nantes), a permis d'étudier les risques conchylicoles en baie de Quiberon. Les objectifs étaient d'identifier les facteurs responsables de ces mortalités, d'analyser les mécanismes en jeu (rôle des facteurs naturels et anthropiques, processus, conditions favorisantes...), d'évaluer les conséquences socio-économiques (incluant les outils de couverture du risque) et de proposer des pratiques individuelles et des mesures collectives visant à mieux gérer et contrôler ces risques.

II.2.A.a. Température

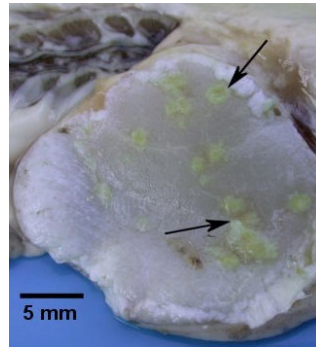
L'huître creuse est une espèce connue pour son excellente tolérance vis-à-vis des variations thermiques. Cependant, il apparaît que le facteur température peut engendrer des modifications au niveau physiologique de cette espèce, notamment en termes de gamétogenèse (Chavez-Villalba *et al.*, 2003). L'augmentation de la température favorise le développement des gonades, demandant à l'huître un besoin énergétique considérable et une consommation en oxygène plus importante. Or, la solubilité de ce gaz dans l'eau de mer diminue avec l'augmentation de la température, augmentant les risques d'hypoxie métabolique. L'un des résultats obtenu durant le projet RISCO montre que l'année 2006 se distinguait par des conditions météorologiques exceptionnelles (été et automne anormalement chauds et peu ventés). Les modèles hydrodynamiques (validés par des mesures physico-chimiques) ont montré que ces conditions ont pu générer des stratifications thermiques importantes à l'origine d'hypoxie, notamment dans la partie profonde et envasée de la baie de Quiberon.

De plus, des études ont rapporté que l'augmentation de température influence la multiplication des agents pathogènes (Johansson *et al.*, 2002). L'élévation de la température favorise également les infections à OsHV-1 (Le Deuff *et al.*, 1996), très souvent détectées lors des phénomènes de mortalité massive (Garcia *et al.*, 2011; Renault *et al.*, 1994b).

II.2.A.b. Pluviométrie et substances toxiques

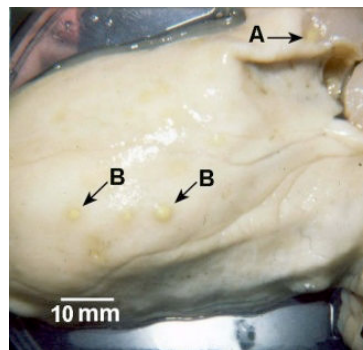
Des études ont montrés que les taux de mortalité et de pluviométrie étaient fortement corrélés (Costil *et al.*, 2005). En effet, l'intensité des précipitations sur le bassin versant, les débits de rivières et la salinité peuvent être des facteurs modifiant les écosystèmes des zones ostréicoles. De plus, ces apports d'eau douce, peuvent drainer des polluants, tels que les herbicides qui interfèrent sur la qualité de l'environnement nutritionnel, contribuant ainsi fragiliser l'équilibre physiologique de l'huître (Stachowski-Haberkorn, 2008). Une toxicité de l'eau de mer d'origine terrigène a par ailleurs été mise en évidence par les tests de mortalité embryo-larvaire au cours des années 2011 et 2012 (RISCO).

- A. Lésions causées par le parasite *Mikrocytos mackini* au niveau du muscle adducteur de *C. gigas*



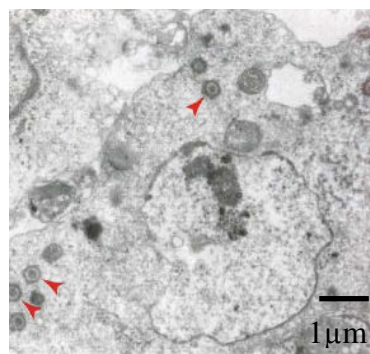
Fisheries and Oceans Canada

- B. Lésions causées par la bactérie *Nocardia crassostreae* au niveau du muscle adducteur et du corps de *C. gigas*



Bower and McGladdery, 2003

- C. Cellules infectées contenant des particules virales de type iridovirus chez *C. gigas* (MET).



Renault, 2006

Figure 4 : Exemple de trois agents pathogènes pour l'huître creuse, *Crassostrea gigas*

II.2.B. Rôle des agents infectieux

II.2.B.a. Parasites protozoaires

Plusieurs parasites protozoaires ont été décrits chez les huîtres creuses.

Mikrocytos mackini, responsable de la maladie de l'île de Denman a été signalée pour la première fois au Canada (Farley *et al.*, 1988) (**Figure 4.A**, p24). La maladie caractérisée par des lésions focales sur le manteau peut induire des mortalités.

Un autre parasite unicellulaire, *Perkinsus marinus*, a été signalé infectant l'huître creuse du Pacifique sur la côte Est des Etats-Unis. *Perkinsus marinus* est un agent pathogène classé par l'Organisation mondiale de la santé animale (OMSA) (OIE, 2013) et l'UE (Directive 2006/88/CE). *C. gigas* est cependant moins touchée par les mortalités liées à ce parasite que cette *C. virginica*.

Le parasite, *Haplosporidium nelsoni*, a d'abord été décrit chez *C. gigas* sur la côte Est des Etats-Unis (Haskin et Andrews, 1988) puis en France (Renault *et al.*, 2000c), en Corée et au Japon (Kamaishi et Yoshinaga, 2002). Cependant, *C. gigas* apparaît moins sensible à *H. nelsoni* en comparaison à d'autres espèces subissant des mortalités massives notamment sur la côte Est des Etats-Unis.

Le parasite *Marteiloides chungmuensis* infectant les ovocytes d'huîtres du Pacifique a été détecté dans différentes régions d'Asie (Comps *et al.*, 1986; Itoh *et al.*, 2003). Ce parasite n'est pas associé à des mortalités massives, mais peut être lié à des problèmes de recrutement.

II.2.B.b. Bactéries

Les maladies bactériennes ont été largement documentées pour les stades larvaires de différentes espèces de bivalves (Lauckner, 1983; Sindermann, 1990). Des bactéries appartenant au genre *Vibrio* ont été signalées en association avec de fort taux de mortalité chez les larves d'huîtres (Kaspar et Tamplin, 1993; Lambert *et al.*, 1998; Paillard *et al.*, 2004). Ces bactéries ont également été rapportées durant des épisodes de mortalité chez les huîtres adultes et juvéniles (Gay *et al.*, 2004; Lacoste *et al.*, 2001). Les vibrions sont omniprésents

dans les écosystèmes aquatiques. Il s'agit de bactéries thermo-dépendantes qui possèdent la capacité d'entrer en état de dormance. Bien que certaines espèces de *Vibrio* améliorent les taux de croissance des mollusques, d'autres espèces de *Vibrio* sont des agents pathogènes. *Vibrio splendidus* et *V. aestuarianus* ont été isolés à partir d'huîtres creuses pendant des épisodes de mortalités estivales en France (Garnier *et al.*, 2008, 2007; Lacoste *et al.*, 2001; Le Roux *et al.*, 2002). En France, une étude réalisée sur quatre ans (2003-2007) chez *C. gigas*, a permis d'identifier les bactéries les plus abondantes isolées lors de 92 épisodes de mortalité. Ce travail a confirmé la forte présence de *V. splendidus* et *V. aestuarianus*, et a permis l'identification de souches de *V. harveyi* particulièrement en 2007 (Saulnier *et al.*, 2009). Enfin, *V. tubiashii* a été rapporté en Angleterre et aux Etats-Unis lors d'épisodes de mortalité d'huîtres de moins d'un an (Elston *et al.*, 2008; Jeffries, 1982). Plus récemment, *V. tubiashii* a été observé en France dans une écloserie (Travers *et al.*, 2014). Des mortalités sans précédent ont été décrites chez des huîtres adultes en 2012 et 2013 impliquant *V. aestuarianus* (Travers *et al.*, comm. pers.).

Nocardia crassostreae, actinomycète à Gram-positif, a été signalé depuis la fin des années 1940 au Japon et la côte ouest de l'Amérique du Nord, en association avec des mortalités observées chez *C. gigas* dans le milieu naturel (Beattie *et al.*, 1988; Bower *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 1991; Numachi *et al.*, 1965) (**Figure 4.B**, p24).

II.2.B.c. Virus

L'absence de lignées cellulaires de mollusques marins rend impossible le diagnostic viral basé sur la recherche d'effets cyto-pathogènes *in vitro*. Différents virus ont été cependant signalés chez l'huître creuse, *C. gigas*. Un virus de type iridovirus a été décrit pour la première fois infectant les huîtres creuses françaises (Bonami, 1977; Comps et Bonami, 1977) (**Figure 4.C**, p24). À la fin des années 1970 et au début des années 1980, les mortalités élevées de larves d'huîtres creuses ont été signalées dans des écloséries commerciales de l'État de Washington aux États-Unis avec la détection d'un virus de type iridovirus (Elston, 1979; Elston et Wilkinson, 1985).

Un virus morphologiquement semblable aux membres de la famille *Herpesviridae* a été décrit par Farley et coll. (1972) chez *C. virginica*. Par la suite, ce même type de virus a été décrit

chez des huîtres creuses, *C. gigas*, dans différents pays, en France (Arzul *et al.*, 2001b; Le Deuff *et al.*, 1994; Nicolas *et al.*, 1992; Renault *et al.*, 1994a, 1994b) en Nouvelle-Zélande (Hine *et al.*, 1992), aux Etats-Unis (Friedman *et al.*, 2005) et au Mexique (Vásquez-Yeomans *et al.*, 2010). Ces virus de type herpesvirus étaient généralement associés à de forts taux de mortalité chez cette espèce. Le virus infectant les larves d'huîtres a été classé en tant que membre de la famille *Herpesviridae*, sous le nom d'Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) (Davison, 2002; Davison *et al.*, 2005; Minson *et al.*, 2000).

Des néoplasies touchant les cellules circulantes chez les bivalves sont encore aujourd'hui d'étiologie incertaine. Cependant, l'implication de rétrovirus dans le processus a été suspectée. Chez les coquillages, d'autres virus ont été décrits et interprétés comme appartenant aux *Papovaviridae* (Garcia *et al.*, 2006), *Togaviridae*, *Reoviridae*, *Birnaviridae* et aux *Picornaviridae* (Renault et Novoa, 2004).

II.3 Moyens de lutte contre les maladies infectieuses

Vivant en milieu ouvert, les huîtres sont directement exposées à un large panel d'agents pathogènes. Elles possèdent uniquement un système immunitaire inné pour lutter contre les maladies (Gestal *et al.*, 2008; Roch, 1999). Ainsi, la vaccination au sens conventionnel du terme ne peut pas être utilisée pour les protéger contre les agents pathogènes. De plus, le comportement des huîtres malades/infectées est généralement très difficile à observer du fait de la présence de la coquille et de leur élevage sur estran limitant le contrôle quotidien de leur état de santé. Enfin, de nombreux transferts de différentes espèces de mollusques entre les zones de production sont réalisés (Anderson *et al.*, 2004; Calvo *et al.*, 2001; Goulletquer et Héral, 1997; Grizel et Héral, 1991). Or, les transferts d'animaux peuvent avoir un impact positif sur le développement du secteur de l'aquaculture des mollusques (Goulletquer et Héral, 1997; Grizel et Héral, 1991), ils peuvent également être une menace majeure en termes de transferts d'agents pathogènes. Des efforts ont déjà été accomplis afin d'améliorer la gestion des maladies infectieuses, mais ils doivent être poursuivis.

La variabilité génétique semble être un déterminant majeur de la sensibilité à un agent infectieux (Huvet *et al.*, 2004). La sélection génétique basée sur la survie, a permis d'obtenir des familles plus ou moins impactées par les mortalités massives survenant sur l'estran

(Dégremont *et al.*, 2010; Enriquez-Diaz *et al.*, 2003; Farley *et al.*, 1998; Nell *et al.*, 2000; Nell et Perkins, 2006). Les écloséries conchylicoles (conditions de culture contrôlées) apparaissent comme les structures les plus adaptées pour fournir ces animaux. Elles peuvent contribuer au développement d'un commerce international de gamètes de bivalves et de larves, permettant la distribution de semences améliorées au travers de programmes de sélection. En outre, la disponibilité de tests efficaces pour la détection d'agents pathogènes peut faciliter le dépistage chez les animaux avant les transactions commerciales et constituer une garantie de qualité pour les ostréiculteurs.

Différentes approches (UV, ozonation, chloration, ...) existent afin de réduire la présence d'agents pathogènes dans l'eau. En particulier, en Europe, les écloséries de mollusques utilisent les UV pour traiter l'eau à l'entrée des installations.

En raison de l'impossibilité d'utiliser la vaccination pour des animaux invertébrés essentiellement élevés dans le milieu extérieur, les moyens de lutte contre l'infection virale à OsHV-1 sont limités et reposent essentiellement sur (1) la surveillance des stocks et des transferts afin de limiter la propagation de l'agent infectieux, (2) sur l'amélioration génétique pour l'obtention d'animaux présentant de meilleurs taux de survie et une meilleure résistance à l'infection, (3) la mise en œuvre de techniques d'élevage adaptées, (4) une meilleure compréhension des interactions complexes entre animal, virus et environnement et (5) des approches novatrices permettant de stimuler les capacités de défense des huîtres.

Tableau I: Récapitulatif des différentes caractéristiques des herpèsvirus humains et de l'huître creuse

Hôte	Désignation	Nom usuel	Genre	Famille	Sous famille ou famille	Taille du génome (kpb)	groupes génomiques	Durée du cycle	Tropisme cellulaire	Siège de la latence	G+C (%)	date decouvert
Humain	HHV-1	<i>Herpes virus simplex 1 (HSV-1)</i>	Simplexvirus	Herpesviridae	Alpha (α)	152	E	court	Cellules cutanéomuqueuses, neurones	Ganglion de Gasser	67	1919
	HHV-2	<i>Herpes virus simplex 2 (HSV-2)</i>	Simplexvirus		Alpha (α)	154	E	court	Cellules cutanéomuqueuses, neurones	Ganglions sacrés	69	1968
	HHV-3	<i>Virus Varcella-Zoster (VZV)</i>	Varicellovirus		Alpha (α)	125	D	court	Cellules cutanéomuqueuses, neurones, cellules sanguines	Ganglions rachidiens Ganglions des paires crâniennes	46	1953
	HHV-4	<i>Virus d'Epstein Barr (EBV)</i>	Lymphocryptovirus		Gamma (γ)	172	C	variable	Cellules épithéliales, lymphocytes B, neurones	Lymphocytes B	60	1964
	HHV-5	<i>Cytomégalovirus Humain (HCMV)</i>	Cytomégalovirus		Bêta (β)	229	E	long	Cellules épithéliales, cellules CD34, leucocytes, cellules endothéliales	Cellules hematopoetiques	57	1956
	HHV-6 A	<i>Roséolovirus</i>	Roséolovirus		Bêta (β)	159	A	long	Lymphocytes T, monocytes, cellules épithéliales et nerveuses	Monocytes	43	1986
	HHV-6 B	<i>Roséolovirus</i>	Roséolovirus		Bêta (β)	162	A	long	Lymphocytes T, monocytes, cellules épithéliales et nerveuses	Monocytes	43	1988
	HHV-7		Roséolovirus		Bêta (β)	145	A	long	Lymphocytes T4, cellules épithéliales	CD4+	40	1990
	HHV-8	<i>Virus du Sarcome de Kaposi (KSHV)</i>	Rhadinovirus		Gamma (γ)	165	B	variable	Cellules épithéliales, lymphocytes B, neurones	Lymphocytes B	54	1994
Huître	OsHV-1	<i>Virus de l'huître creuse, Ostreid herpesvirus 1</i>		Malacoherpesviridae	/	207	E	?	?	?	39	1972

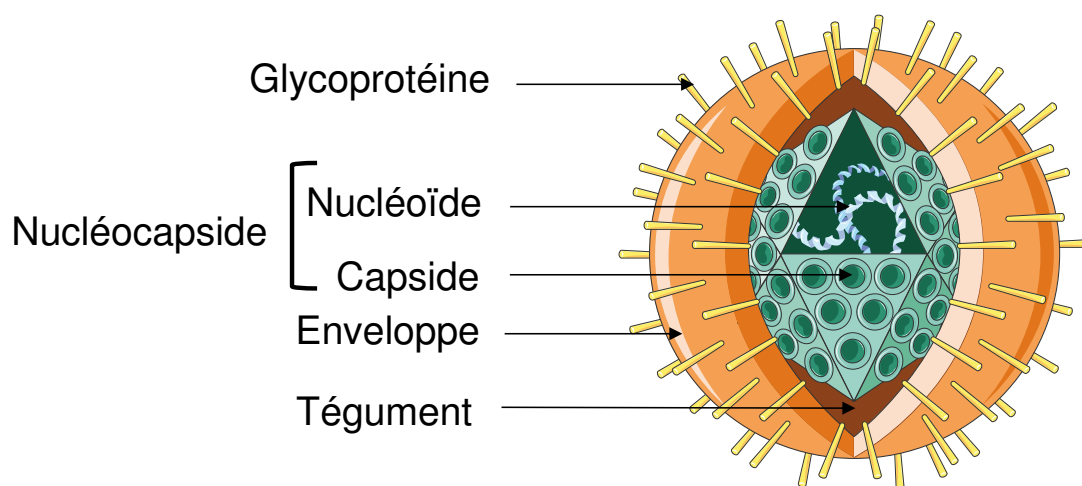


Figure 5: Structure d'une particule de type herpesvirus

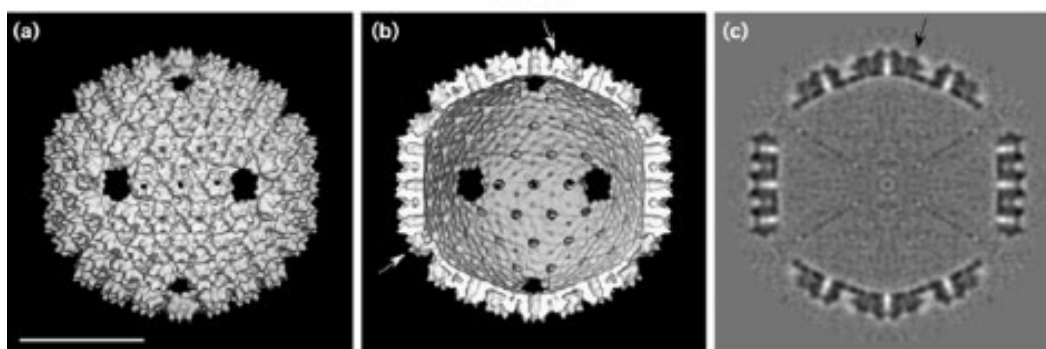


Figure 6: Reconstruction microscopique par cry-electron de la capside du virus OsHV-1. (a) surface extérieure, (b) surface intérieure et (c) coupe centrale. Les flèches représentent les triplex reliant les sous-unités protéomiques. Barre, 50nm (Davison *et al.*, 2005).

III. OsHV-1 : un membre de la grande famille des herpèsvirus

III.1 Structure

Comme les herpèsvirus de vertébrés, OsHV-1 comporte un nucléoïde (ADN), une capside, un tégument et une enveloppe (**Figure 5**, p30). Chez les herpèsvirus, une capside virale mature comprend une couche externe formée de pentons, qui sont des sous-unités de la protéine majeure de la capside. La capside virale est également formée des hexons intégrant différentes protéines (par e

xemple, VP5 et VP23 chez HSV-1 (Newcomb *et al.*, 1996, 1993). Ces sous-unités sont reliées entre elles par un triplex formé par des protéines mineures de la capside. Chez HSV-1, deux gènes non structuraux (UL26 et UL26.5), codant chacun deux protéines, sont impliquées dans la formation de la capside. La formation complète de la capside ne nécessite aucune composante cellulaire et peut se réaliser *in vitro* en utilisant seulement les protéines virales requises (Newcomb *et al.*, 1999).

La capside d'OsHV-1 de symétrie icosaédrique est similaire à celle d'HSV-1, elle est constituée de 162 capsomères, 150 hexons et 12 pentons (Davison *et al.*, 2005) (**Figure 6**, p30). Son treillis géométrique en surface est observé uniquement chez les herpèsvirus. Le diamètre de sa capside a été estimé inférieur à celle d'HSV-1, 116 nm contre 125 nm (Davison *et al.*, 2005). Le tégument est souvent réparti de façon asymétrique autour de la capside et sa taille peut varier en fonction de la localisation du virus dans la cellule (Renault *et al.*, 1994a). L'enveloppe entourant la capside et le tégument consiste en une membrane lipidique (Roizman et Batterson, 1985). Cette enveloppe d'origine cellulaire, comporte un nombre variable de protéine de structure allant de 15 à 35 selon les herpèsvirus (Strnad et Aurelian, 1976). Certaines de ces protéines sont glycosylées et impliquées dans l'attachement et la pénétration du virus dans la cellule hôte.

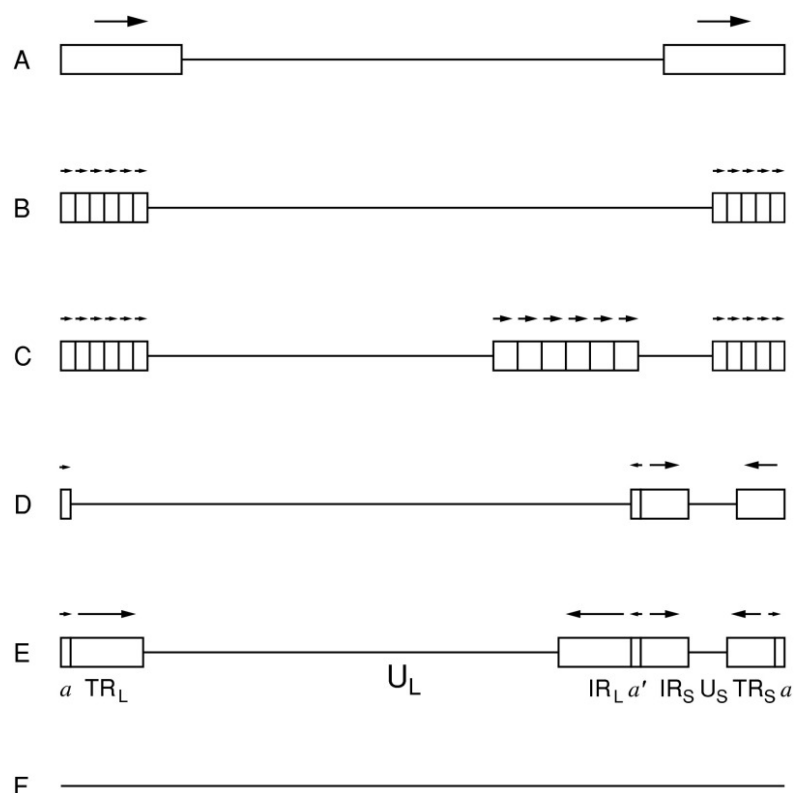


Figure 7: Organisation génomique des Herpesviridae par (Roizman et Pellett, 2001). Les régions uniques sont représentées par des lignes horizontales et les régions répétées par des rectangles. Les flèches montrent le sens des séquences. « a » indique des régions terminales répétées et « a' » correspond à la région « a » inversée.

III.2 Génome

La présence des séquences répétées chez les herpesvirus a conduit à la définition de six classes génomiques différentes, désignées par les lettres de « A à F » et indépendamment des sous familles virales (Roizman et Pellett, 2001) (**Figure 7**, p32).

- Classe A : un seul groupe de séquences répétées dans la partie terminale de la molécule d'ADN, disposées dans la même orientation. Cette organisation est présente dans le génome du virus du poisson chat (Channel Catfish Virus).
- Classe B : nombreuses répétitions d'un groupe de séquences présentes aux deux extrémités terminales orientées dans la même direction (herpesvirus des singes saïmiris et atèles)

- Classe C : nombreuses répétitions du même groupe de séquences dans les deux extrémités orientées de la même manière avec une répétition en tandem des différentes séquences situées à l'intérieur du brin de la molécule d'ADN (virus d'Epstein Barr, EBV)
- Classe D : un seul groupe de séquences terminales, répétitives à l'intérieur, encadrée d'un sous-groupe de séquences terminales répétitives aux deux extrémités et orienté de la même manière (virus de la varicelle, VZV)
- Classe E : un seul groupe de séquences terminales aux deux extrémités, répétées et inversées à l'intérieur et un sous-groupe de séquences terminales répétées aux deux extrémités et orientées dans le même sens (herpèsvirus simplex 1 et 2 (HSV-1, HSV-2) et cytomégalovirus (HCMV))
- Classe F : des itérations de séquences au sein des génomes de classe F n'ont pas été décrites. Cette classe est représentée par un membre des β -herpèsvirus, retrouvé chez le tupaïa (mammifère qui ressemble à des écureils) (THV)

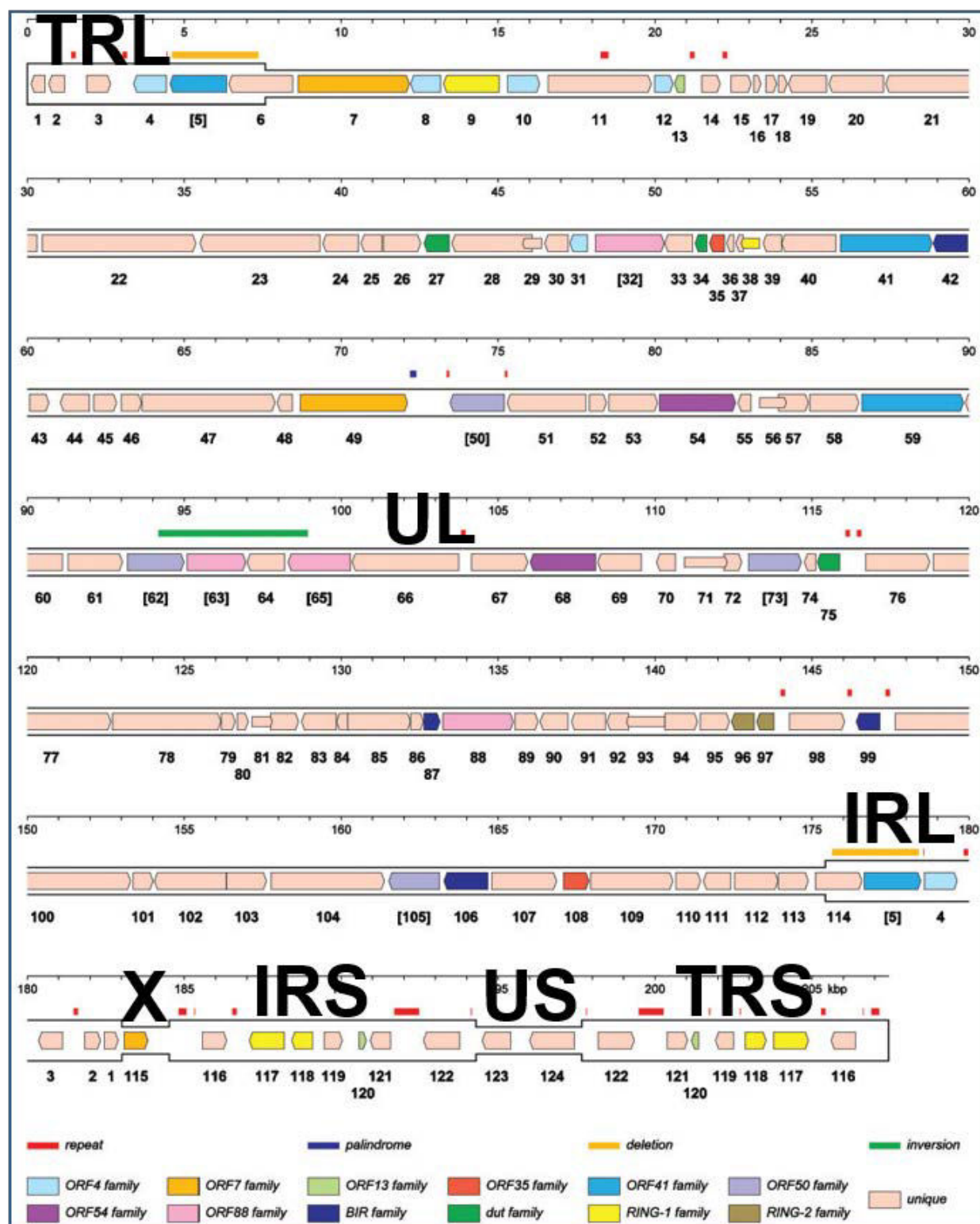


Figure 8: Structure du génome et distribution des gènes viraux d'OsHV-1. Les numéros représentent les ORFs et les flèches l'orientation des séquences. Les régions répétées et inversées sont représentées dans un format plus épais. Les crochets autour de certains ORFs indiquent ceux dont la région codante est fragmentée (modifié d'après Davison *et al.*, 2005).

Le virus OsHV-1 a été purifié à partir des larves de *C. gigas* infectées (Le Deuff et Renault, 1999). Ainsi, le séquençage complet du virus a pu être réalisé (GenBank AY509253) (Davison *et al.*, 2005). L'organisation du génome viral est très proche de la classe E. Le génome est constitué de deux régions uniques non répétées : une région longue (UL : unique long, 167 843 pb) et une région courte (US : unique short, 3 370 pb). Ces deux régions sont flanquées de séquences répétées inversées : TRL/IRL (7 584 pb) et TRS/IRS (9 774 pb). Enfin, la séquence nommée X (1 510 pb) est une région unique retrouvée entre les séquences IRL et IRS. Ainsi, le génome peut être représenté sous la forme suivant et: TRL–UL–IRL–X–IRS–US–TRS (**Figure 8**, p34).

Le génome des herpesvirus présente une taille variable entre 125 et 245 kpb dont la composition en G+C est comprise entre 32 et 74 % (Honess, 1984). Le nombre de cadres de lecture ouverts (ORFs) est une caractéristique de chaque virus et varie d'environ 68 pour VZV à plus de 200 pour HCMV. La taille du génome d'OsHV-1 est relativement grande, 207 439 pb (contre 152 kpb pour HSV-1) pour 124 ORFs (**Figure 8**, p34) (Davison *et al.*, 2005). Cependant, 12 de ces séquences (cinq localisées dans la région TLR/IRL et sept dans la région IRS/TRS) sont répétées inversées, portant à 136 le nombre d'ORFs présent dans le génome (**Figure 8**, p34). Ce chiffre inclut huit gènes fragmentés et comptés une seule fois. Aucune indication d'épissage n'a été identifiée à partir de l'analyse du génome. Par ailleurs, des cadres de lecture chevauchant sont observés dans la région UL : les ORFs 28-29, ORFs 37-38, ORFs 56-57, ORFs 71-72, ORFs 81-82, ORFs 92-93.

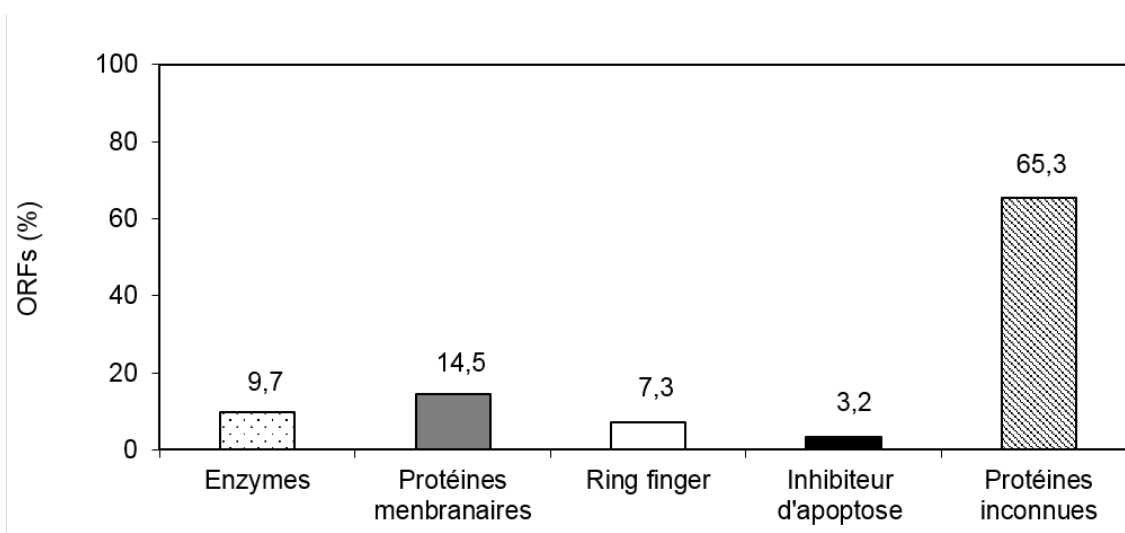


Figure 9: Représentation schématique de la répartition des 124 ORFs du virus OsHV-1 selon 5 groupes

D'après les données de séquençage (Davison *et al.*, 2005), des groupes d'ORFs ont pu être identifiés en tenant compte de leur motif ou fonction prédite (**Figure 9**, p36):

- 12 gènes codant pour des enzymes regroupant des ATPase (ORF109), hélicases (ORF7, ORF49, ORF67, ORF115), primase (ORF24), DNA polymérase (ORF100), DUTpases (ORF27, ORF34, ORF75), ribonucleotide réductase (ORF20, ORF51).
- 18 gènes codant des protéines membranaires (ORF16, ORF25, ORF 32, ORF36, ORF41, ORF54, ORF57, ORF59, ORF63, ORF65, ORF68, ORF72, ORF77, ORF80, ORF84, ORF88, ORF103, ORF111)
- Neuf gènes possédant des motifs RING-finger (ORF9, ORF38, ORF53, ORF96, ORF97, ORF117, ORF118, ORF121, ORF124). Les protéines possédant ces motifs à doigt de zinc sont impliquées dans la transcription.
- Quatre gènes codant pour des inhibiteurs d'apoptose ayant le motif Baculovirus Inhibitor of apoptosis Repeat (BIR) (ORF42, ORF87, ORF99, ORF106)
- 81 gènes codant pour des protéines de fonctions inconnues, ce qui représente 65,3 % du génome total.

III.3 Classification

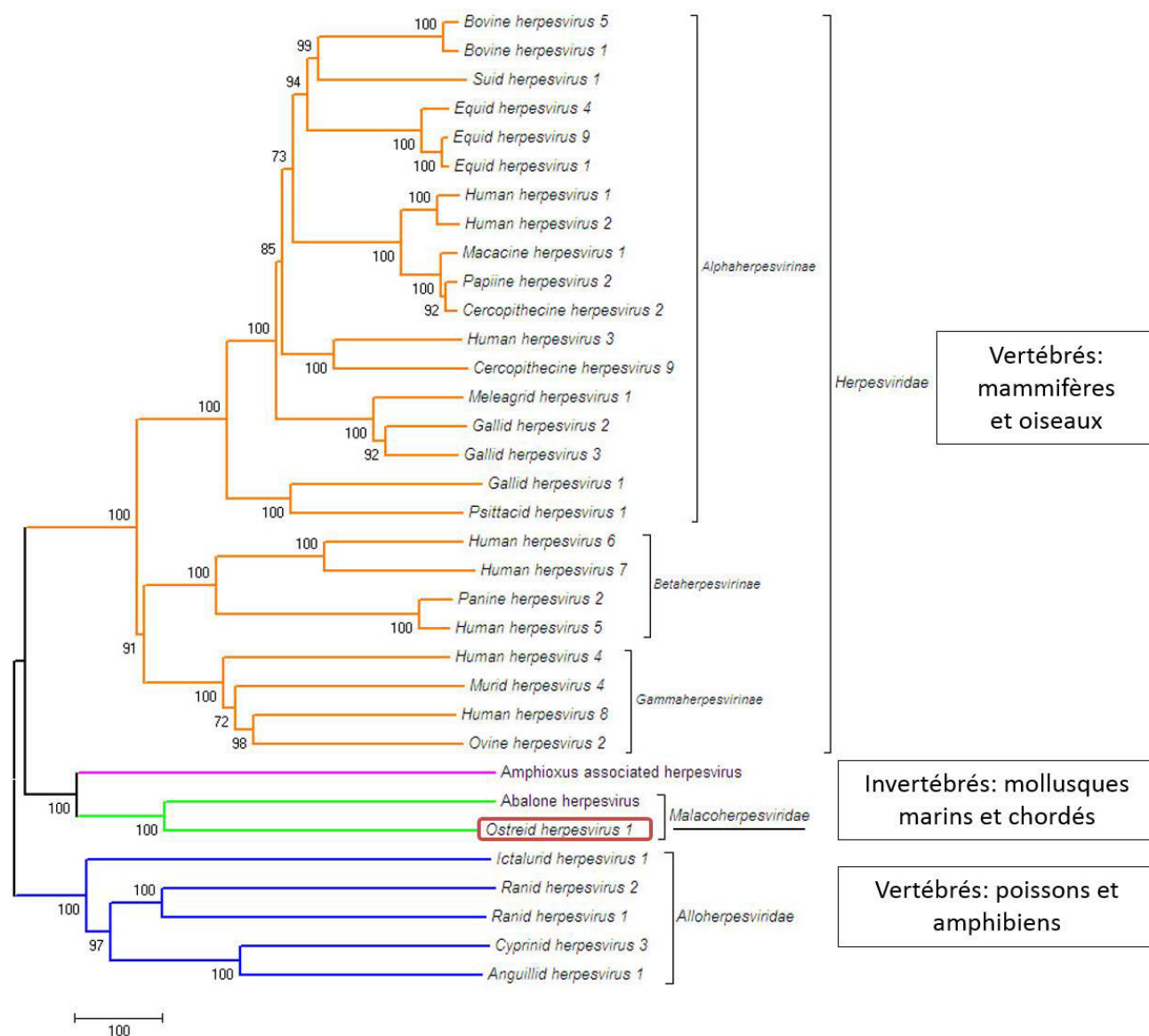


Figure 10: Dendrogramme concaténé à partir de la séquence d'ADN polymérase de 34 herpèsvirus (modifié d'après Savin *et al.*, 2010).

OsHV-1 fait partie de l'ordre *Herpesvirales*, mais n'appartient pas à la famille *Herpesviridae*. Cette famille a pu être organisée en trois sous familles dans lequel figurent les *Alpha* (α), *Beta* (β) *Gammaherpesvirinae* (γ).

En effet, les protéines codées par OsHV-1 ne présentent que très peu d'homologies avec celles d'autres herpèsvirus de vertébrés à l'exception de l'ORF109 codant pour la sous unité ATPase de la terminase. La terminase intervient dans l'empaquetage de l'ADN viral dans la capside et est retrouvée chez tous les herpèsvirus connus (Davison, 2002; Davison *et al.*, 2005). La présence de ce gène laisse suspecter une origine commune entre OsHV-1 et les autres herpèsvirus. Cependant, l'hypothèse d'une évolution convergente peut être aussi avancée dans la mesure où un gène comparable a également été décrit chez les bactériophages T4 (Mitchell *et al.*, 2002).

Néanmoins, d'autres éléments laissent également penser qu'OsHV-1 est un membre de la grande famille des herpèsvirus. Comme décrit précédemment, sa structure icosaédrique et la structure de ses capsides, la présence d'une enveloppe, l'ADN double brin linéaire ou encore l'organisation de son génome supportent ce fait.

OsHV-1 a donc été classé comme étant le premier membre de la nouvelle famille *Malacoherpesviridae* au sein de l'ordre *Herpesvirales* (Davison *et al.*, 2009, 2005) (**Figure 10**, p37). Plus récemment, un autre membre a été classé parmi les *Malacoherpesviridae*, le virus de l'ormeau (Abalone Herpesvirus 1, AbHV-1) dont les caractéristiques semblent proches de celles d'OsHV-1 (Savin *et al.*, 2010). Savin *et al.* (2010) ont proposé la création d'un nouveau genre appelé *Haliotivirus*. Enfin, l'herpèsvirus du pétoncle chinois, *Chlamys farreri*, ou « Acute Viral Necrosis Virus » (AVNV) a été rattaché à l'ordre *Herpesvirales*. Deux études récentes suggèrent qu'AVNV serait un variant d'OsHV-1 (Renault *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2013).

L'étude phylogénétique de Savin *et al.* (2010) souligne la nature unique du virus associé à amphioxus (*Branchiostoma floridae*), un invertébré marin (chordé) vermiforme. Ces auteurs propose d'appeler ce virus, Branchiostomid herpèsvirus 1 et de le classer parmi une nouvelle famille appelée *Aspondyloherpesviridae*.

III.4 Le virus et son hôte

III.4.A. Cycle de réplication

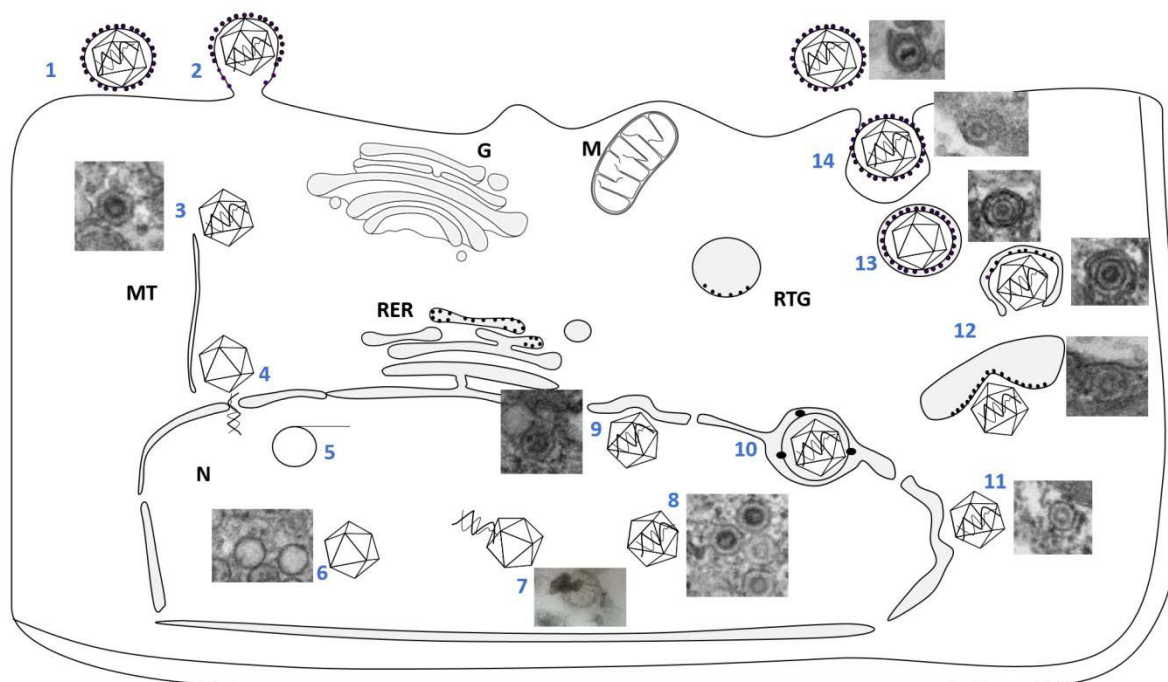


Figure 11: Cycle de réplication hypothétique d'OsHV-1 (Renault et Segarra in prép.). (1) adsorption du virus par cellule cible et (2) fusion avec la glycoprotéine membrane. (3) perte d'une grande partie du téguement. (4) nucléocapsides transportées par les microtubules (MT) vers le pore nucléaire, (5) ADN viral libéré et transcrit dans le noyau (N) puis réplication de l'ADN viral. (6) Assemblage de la capsid. (7) conditionnement de l'ADN viral et (8) entrée de l'ADN viral dans la capsid. (9) la nucléocapside fusionne avec la membrane nucléaire interne. (10) la nucléocapside atteint ensuite la membrane nucléaire externe puis (11) est libérée dans le cytoplasme. (12) la capsid «nue» acquière son enveloppe finale au niveau du réseau trans-golgien (RTG) formant une vésicule. (13) les virions matures entrent dans la vésicule pour être transportés vers la membrane cellulaire qui sera ensuite (14) libérée par exocytose.

L'absence de lignées cellulaires provenant de bivalves marins ainsi que l'impossibilité d'infecter des lignées cellulaires hétérologues avec OsHV-1, ne permettent pas actuellement d'étudier et d'observer le cycle de réplication du virus *in vitro* (Deniau, 2000; Deuff *et al.*, 1994). Cependant, la microscopie électronique à transmission (MET) a permis d'acquérir suffisamment de données en ultrastructure chez des animaux infectés pour proposer un schéma de réplication proche de celui des autres herpesvirus (**Figure 11**, p39).

III.4.A.a. Entrée du virus dans la cellule

L'attachement spécifique du virus sur des récepteurs cellulaires (étape de reconnaissance) est l'étape initiale de l'infection (**Figure 11**(1), p39). A ce jour, le mécanisme d'entrée d'OsHV-1 reste inconnu. Le virus HCMV montre une affinité marquée au travers des molécules gM/gN et gB de son enveloppe vis-à-vis de récepteurs cellulaires tels que le sulfate d'héparane (HSPG) (**Figure 12**, p41). De récents travaux suggèrent l'implication de protéines de type glypican (Renault *et al.*, 2011; Segarra *et al.*, 2014b) et intégrine (Jouaux *et al.*, 2013) dans la reconnaissance d'OsHV-1 par les cellules d'huîtres creuses.

Les glycoprotéines situées à la surface de l'enveloppe virale jouent un rôle déterminant dans la pénétration du virus. Onze glycoprotéines d'enveloppe ont été identifiées chez HSV-1. Pour l'attachement du virus HCMV, il n'existe pas de récepteur cellulaire spécifique. En effet, les glycoprotéines d'enveloppe interagissant avec de très nombreuses protéines cellulaires, il est difficile de définir un récepteur type. Cependant, le principal récepteur décrit est le récepteur de l'Epithelial Growth Factor (EGF-R).

De manière générale, le tropisme de chaque virus (**Tableau I**, p29) est défini en fonction de la présence d'un ou plusieurs récepteurs cellulaires. L'adsorption du virus à la surface cellulaire est suivie par la fusion des membranes virale et cellulaire (**Figure 11**(2), p39).

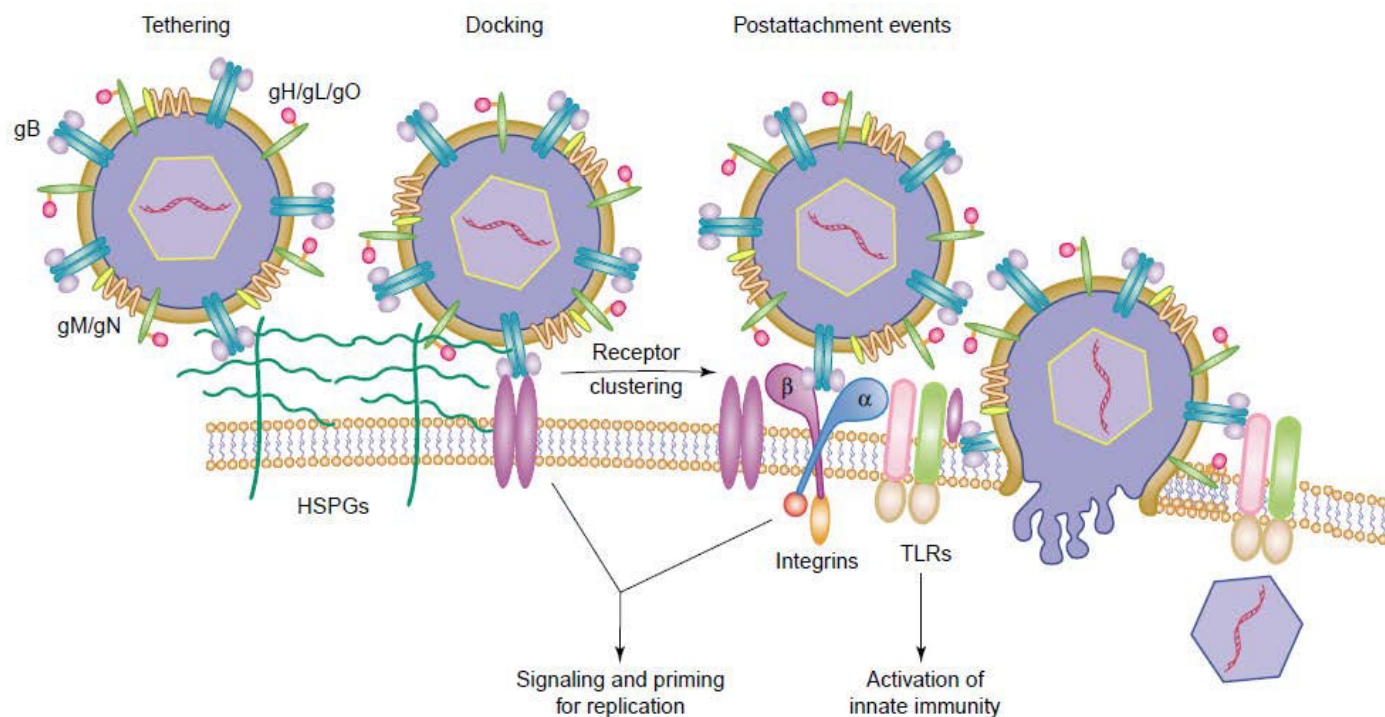


Figure 12: Schéma d'entrée du HCMV dans une cellule (Compton, 2004)

Cette étape est le fruit d'une série d'interactions entre le virus et la future cellule hôte, la fixation aux Toll Like Receptors (TLR) activerait ainsi la réponse immunitaire innée (Compton, 2004) (**Figure 12**, p41). Immédiatement après l'entrée du virus, les protéines structurales de la capsid sont dégradées. Les nucléoïdes sont ainsi libérés dans le cytoplasme et acheminés jusqu'aux pores de la membrane nucléaire, via le cytosquelette (**Figure 11**(3), p39). Chez *C. gigas*, la tubuline pourrait être impliquée dans ce transport (Jouaux *et al.*, 2013).

III.4.A.b. Synthèses virales

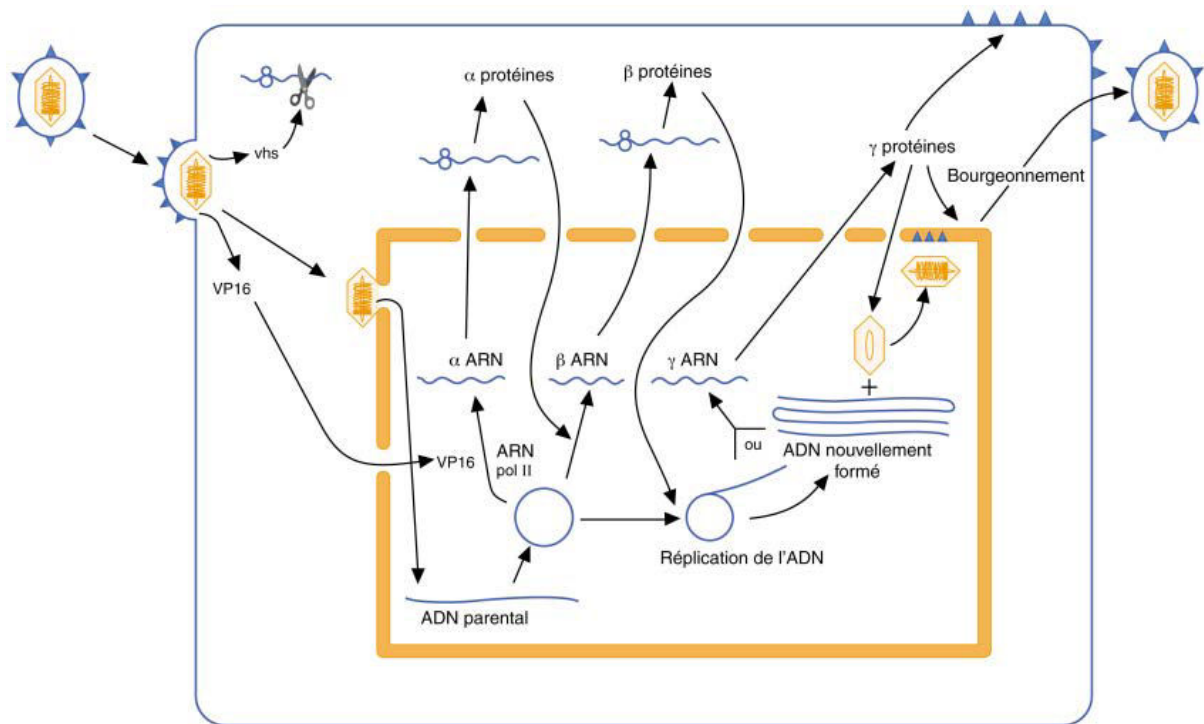


Figure 13: Expression des gènes très précoces (α), précoces (β), et tardifs (γ) chez le virus Herpès Simplex (d'après Roizman et Knipe, 2001).

Chez les herpèsvirus, la transcription des gènes viraux s'effectue en trois phases coordonnées: la phase précoce-immédiate (ou très précoce), la phase précoce et la phase tardive (**Figure 13**, p42) (Jenkins et Turner, 1996). Ces trois phases n'ont jamais été étudiées ou décrites chez OsHV-1.

✓ Une phase très précoce IE (Immediate Early)

Dans cette phase, les protéines α régulant les transcriptions virales ultérieures (gènes E) sont produites (Honess et Roizman, 1974). Dans le cas d'HSV-1, la synthèse de ces protéines atteint son maximum en deux à quatre heures après le début de l'infection, puis décroît. La transcription de ces gènes ne requiert pas de synthèses protéiques *de novo*.

✓ Une phase précoce E (Early)

Cette phase va aboutir à la production de protéines $\beta 1$ et $\beta 2$ s'effectuant au maximum cinq à sept heures post infection chez HSV-1. Elles sont impliquées dans divers aspects de la synthèse de l'ADN (Jenkins et Turner, 1996). Par exemple, l'ADN polymérase virale, des hélicase, des ribonucléases réductases ou des kinases se trouvent parmi ces protéines β .

Les Herpesviridae produisent des thymidine kinases et la ribonucléotide réductase afin de faciliter la réplication de leur propre ADN. La thymidine kinase et la ribonucléotide réductase permettent la production de désoxynucléotide tri-phosphate (dNTP), substrats pour la synthèse de l'ADN. Les protéines β sont impliquées dans la régulation de l'expression des gènes viraux. Elles diminuent l'expression des gènes α et elles sont nécessaires pour l'expression des gènes γ .

✓ Une phase tardive L (Late)

C'est au cours de cette phase impliquant des gènes $\gamma 1$ et $\gamma 2$ que le génome viral est dupliqué et les protéines structurales exprimées. En effet, les protéines γ sont pour la plupart, des protéines de structure. Ces gènes sont les derniers exprimés durant le cycle lytique du virus. L'expression des gènes $\gamma 1$ est indépendante de l'ADN viral alors que celle des gènes $\gamma 2$ est liée à une multiplication préalable de cet ADN. Les transcrits des gènes $\gamma 1$ sont exprimés de manière fugace et suivant une régulation de transcription proche de gènes $\beta 2$. La transcription des gènes $\gamma 2$ est quant à elle totalement impossible en cas d'inhibition de la synthèse d'ADN viral.

Les gènes α , β , et γ sont dispersés dans l'ensemble du génome viral, il n'y a donc pas d'organisation apparente du génome en blocs de transcription précoce ou tardive.

III.4.A.c. Réplication de l'ADN viral et formation de nucléocapsides

L'ADN viral, initialement de forme linéaire, se circularise dans le noyau de la cellule hôte grâce à la fusion des extrémités du génome (**Figure 11**(4 et 5), p39). La synthèse de l'ADN viral est alors initiée à partir d'un ou plusieurs points. La durée du cycle de réplication dépend de chaque herpesvirus. Dans le cas d'une infection active, des particule virales du HCMV de

nouvelle génération sont généralement détectées 72 h post infection (Black *et al.*, 1989). La synthèse de l'ADN viral est relativement précoce, puisque chez HSV-1, elle est détectable dès trois heures et se produit jusqu'à 12 heures post-infection (Leon *et al.*, 1977). Cette réplication a lieu dans le noyau selon le mécanisme du cycle roulant (Ben-Porat et Tokazewski, 1977; Jacob et Roizman, 1977). Les capsides sont assemblées dans le noyau (**Figure 11(6)**, p39) et l'ADN viral entrée dans la capside, formant une nouvelle nucléocapside (**Figure 11(7 et 8)**, p39). Après attachement à la membrane interne du noyau, les nucléocapsides acquièrent le tégument (**Figure 11(9 et 10)**, p39) (Rémillard-Labrosse, 2010) et s'accumulent dans l'espace péri-nucléaire.

Chez *C. gigas*, des L-particules (light particles) correspondant à des particules sphériques d'un diamètre compris entre 63 et 76 nm, ont également été observées par MET dans l'espace péri-nucléaire et dans les vésicules cytoplasmiques chez des huîtres infectées par le virus OsHV-1 (Schikorski *et al.*, 2011b). Bien que de telles particules aient été décrites chez HSV-1 et HSV-2 (Dargan and Subak-Sharpe, 1997), leur rôle exact reste encore incertain.

III.4.A.d. Enveloppe virale et libération de la particule

La nucléocapside est ensuite libérée dans le cytoplasme (**Figure 11(11)**, p39) et acquière son enveloppe finale. L'enveloppement des particules virales est expliqué selon deux modèles. Le premier définit cette étape au niveau du noyau et le second au niveau du réseau trans-golgien (**Figure 11(12 et 13)**, p39) (Stackpole, 1969). La nouvelle particule virale mature peut alors être libérée par exocytose (**Figure 11(14)**, p39).

III.4.B. Persistance/Latence et Réactivation

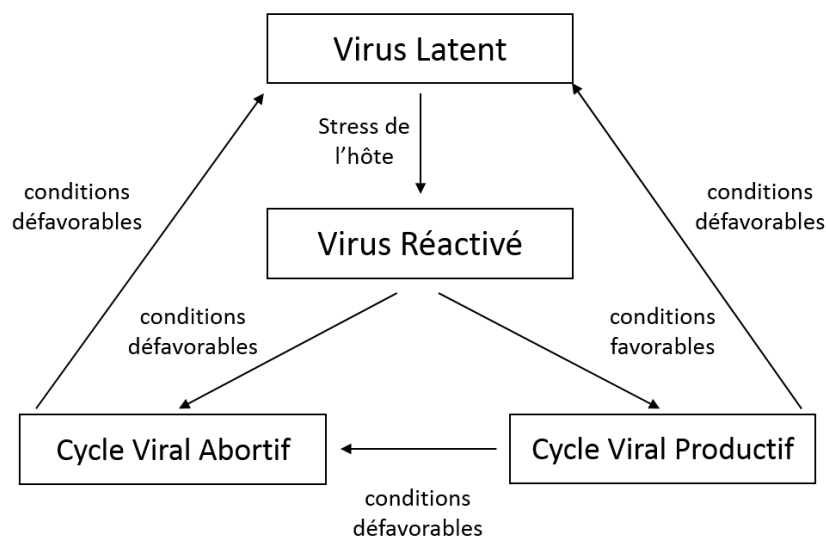


Figure 14: Schéma du cycle viral des *Herpesviridae* (d'après Renault *et al.*, 1997)

La latence est une propriété commune à l'ensemble des herpèsvirus (**Figure 14**, p45). Elle leur permet de persister pendant toute la vie de l'hôte après infection primaire ou secondaire (Roizman et Baines, 1991). On définit la latence comme une persistance silencieuse du virus dans l'organisme (absence de cycle viral lytique et expression d'un nombre réduit de gènes viraux) et non décelable par les méthodes virologiques classiques. Le génome viral se retrouve alors soit sous forme circulaire dans le noyau des cellules, soit intégré dans le génome cellulaire (Garcia-Blanco et Cullen, 1991). Les mécanismes moléculaires de la latence sont complexes et dépendent du virus considéré. Le virus latent s'exprime partiellement dans la cellule : soit sous forme de protéines virales chez VZV, soit uniquement sous forme d'ARN de latence « LAT » (Latency Associated Transcripts) chez HSV, ou les deux associés comme chez EBV. De plus, l'infection latente est localisée dans un type cellulaire particulier, variable selon les virus (**Tableau I**, p29).

La réactivation des herpèsvirus en latence peut être induite par différents stimuli (stress, facteur environnemental, état physiologique de l'hôte). Chez HSV-1, la réactivation résulterait d'un signal de transduction provenant de l'expression du gène codant la protéine ICP0. Ceci induirait la transcription des gènes α (Wilcox *et al.*, 1997). Lorsque le virus est réactivé, on parle de cycle productif ou abortif. Dans le premier cas (cycle productif), il y a alors production intensive de particules virales filles infectieuses, induisant une cytolysse ou

un phénomène d'apoptose cellulaire (mort cellulaire programmée). Dans des conditions moins favorables, le cycle est abortif et produit des particules virales immatures et non infectieuses (particules virales non enveloppées ou capsides vides).

Contrairement aux autres herpèsvirus, aucun gène associé à la latence n'a été décrit à ce jour chez OsHV-1. Ce phénomène de latence/persistance n'a pas encore été clairement démontré chez ce virus malgré la détection d'ADN et de protéines virales chez des huîtres adultes asymptomatiques (Arzul *et al.*, 2002; Barbosa-Solomieu *et al.*, 2004).

III.4.C. Transmission du virus

L'eau est la voie majeure de transmission d'OsHV-1 entre différents individus (Paul-Pont *et al.*, 2013; Sauvage *et al.*, 2009; Schikorski *et al.*, 2011a). En effet, de l'ADN viral a été détecté par PCR en temps réel dans l'eau de mer située à proximité d'huîtres creuses infectées (Sauvage *et al.*, 2009). De plus, des infections expérimentales horizontales par cohabitation entre des individus sains et infectés ont été réalisées suggérant une transmission de l'agent infectieux par l'eau de mer (Schikorski *et al.*, 2011a).

Une transmission verticale de géniteurs *C. gigas* à leur descendance a été suggéré mais ne semble pas systématique (Barbosa-Solomieu *et al.*, 2004).

La maladie peut également être transmise expérimentalement (à 22°C) par injection directe dans le muscle adducteur du naissain d'une suspension virale, obtenue à partir d'animaux naturellement infectés (Schikorski *et al.*, 2011b).

Le virus OsHV-1 est capable d'infecter d'autres bivalves marins que l'huître creuse, *C. gigas*. Ainsi, la transmission inter-espèces au stade larvaire a été démontrée entre *C. gigas* et *C. angulata*, *C. gigas* et *Ostrea edulis* ou *C. rivularis*, *Ruditapes philippinarum* et *C. gigas* (Arzul *et al.*, 2001b). De l'ADN viral a également été détecté par PCR classique chez la palourde européenne *R. decussatus* et la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus*.

III.5 Diversité chez OsHV-1

Les virus à ADN double brin sont moins sujets aux mutations que les virus à ARN. Les génomes des herpesvirus demeurent relativement stables. Néanmoins, différents variants d'OsHV-1 ont été observés depuis ces vingt dernières années. A partir de 1997, un premier variant nommé OsHV-1 var a été mis en évidence chez *C. gigas* et *R. philippinarum* (Arzul *et al.*, 2001c). Ce spécimen viral se caractérise par une délétion de 2.8 kpb au niveau de la région TRL. En 2000, ce même variant a été retrouvé dans des larves de *P. maximus* subissant une mortalité importante en éclosion (Arzul *et al.*, 2001a). Depuis 2008, un autre variant, dénommé μ Var, a été caractérisé dans des échantillons de *C. gigas* prélevés sur les côtes françaises (Segarra *et al.*, 2010 ; **Annexe 1**, p257) . Ce variant apparaît comme jouant un rôle prépondérant dans les épisodes de mortalités. Il a également été observé chez différents mollusques, comme *Donax trunculus*, *Mytilus edulis*, et *M. galloprovincialis* (Guichard *et al.*, 2011). Des spécimens identiques ont été décrits en Europe et des formes très proches en Asie, Nouvelle-Zélande, Australie et Etats-Unis (Renault *et al.*, 2012). Récemment, une délétion de 605 pb a été mise en évidence chez le variant μ Var, plus précisément au niveau des ORF 36 et ORF 37 (codant deux protéines membranaires) et une délétion partielle de l'ORF 38 (codant une protéine de type RING-finger) (Renault *et al.*, 2012). D'autres spécimens proches du variant μ Var ont été détectés avant 2008 chez des huîtres infectées en France, μ Var Δ 15 et μ Var Δ 9 (Martenot *et al.*, 2011). Depuis 2008, le variant μ Var ou des spécimens proches, sont détectés dans la majorité des échantillons *C. gigas*.

III.6 Répartition géographique

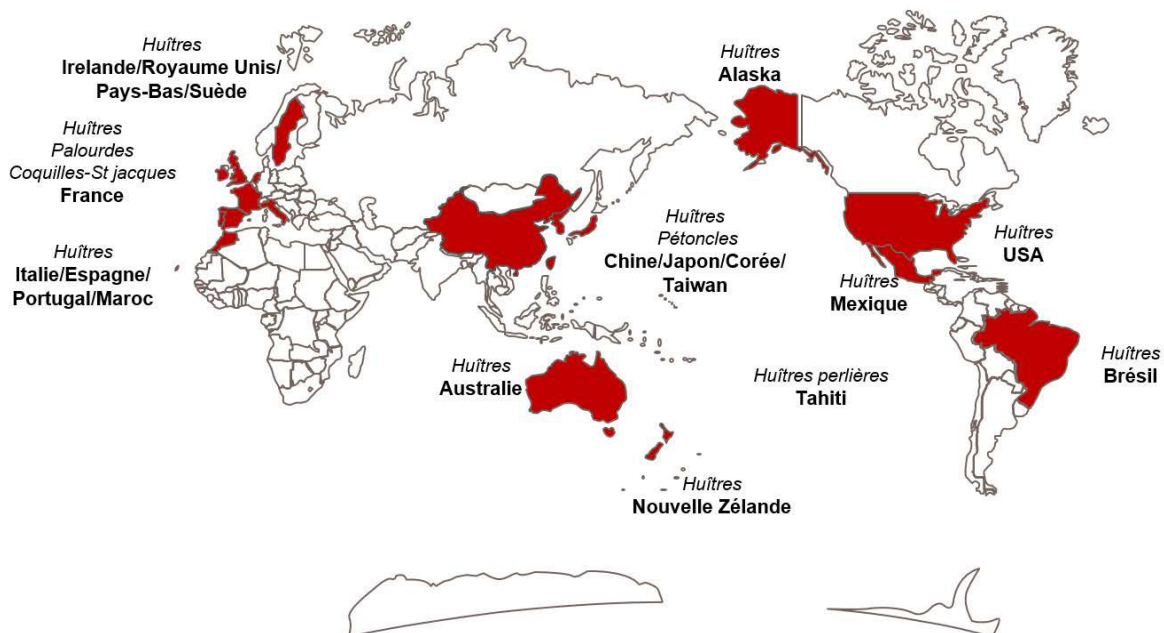


Figure 15: Répartition mondiale d'OsHV-1 et ses variants d'après OIE, 2014

Le virus OsHV-1 a été observé très largement dans différentes zones du monde (**Figure 15**, p48). OsHV-1 a été décrit en Europe (France, Irlande, Italie, Pays-Bas, Portugal, Espagne, Suède et Royaume-Uni), Australie, au Brésil, Chine, Corée, Japon, Maroc, Tunisie, Mexique, Nouvelle-Zélande et aux États-Unis. Le variant μ Var a été rapporté chez l'huître creuse durant des mortalités massives en Europe et des formes proches en Australie et en Nouvelle-Zélande.

IV. Mécanismes de défense chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*

Chez les vertébrés, un ensemble de cellules lymphoïdes et non lymphoïdes communiquent entre elles par l'intermédiaire de molécules messagers pour créer un système immunitaire complexe. Les fonctions de ce système permettent d'une part des réponses rapides (défense innée ou non spécifique) et d'autre part des réponses spécifiques (défense acquise, adaptative ou spécifique) par le biais d'un mécanisme de mémorisation des rencontres précédentes avec des antigènes étrangers. Ce second type de réponse possède une efficacité accrue en ciblant un agent infectieux particulier (Feng, 1988). Le phénomène de mémoire immunitaire chez les vertébrés fait intervenir les lymphocytes. Ce mécanisme est possible du fait de la présence de récepteurs spécifiques portés à la surface de cette catégorie de cellules. Les réponses immunitaires innées chez les vertébrés sont réalisées par les cellules spécialisées (phagocytes mononucléaires, granulocytes, etc.), qui peuvent reconnaître le corps étranger et répondre par la phagocytose et l'inflammation, mais également stimuler les lymphocytes au travers de la présentation de fragments d'antigènes (après dégradation des agents pathogènes) à ces cellules.

Le système immunitaire chez les invertébrés repose uniquement sur les défenses innées ou non spécifiques. Les bivalves marins ne produisent pas d'anticorps spécifiques. Les défenses innées sont manifestées par les traits inhérents anatomiques, physiologiques, biochimiques et comportementaux d'un individu qui le protègent contre les infections. Ce système permet cependant une reconnaissance du soi et du non-soi (Galloway et Depledge, 2001). Il est également caractérisé par une absence du phénomène de mémoire immunitaire portée par les lymphocytes mémoires (Cheng, 1981). Par ailleurs, des barrières physico-chimiques telles que la coquille, les couches de mucus et le manteau représentent des premières lignes de défense contre les agresseurs chez la majorité des invertébrés.

IV.1 La réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée repose sur des mécanismes de défense à médiation cellulaire et humorale.

IV.1.A. La réponse immunitaire innée à médiation cellulaire

Les mollusques bivalves possèdent un système circulatoire de type semi-ouvert où circule l'hémolymphe contenant les hémocytes (Cheng, 1981; Lorteau *et al.*, 1995; Xue et Renault, 2001). Les mécanismes de défense connus à ce jour chez les mollusques bivalves reposent essentiellement sur ces hémocytes. Ces derniers peuvent présenter différentes localisations, dans le compartiment circulatoire (vaisseaux et sinus), mais également dans les tissus (hémocytes fixés : glande digestive, manteau, branchies, gonades). Ces cellules assurent de très nombreuses fonctions (réparation des blessures, réparation de la coquille, excrétion, digestion et transports de nutriments, détoxification des polluants).

La réponse immunitaire mise en place par les hémocytes repose essentiellement sur quatre mécanismes :

- **L'infiltration hémocytaire** est la première réponse cellulaire suite à une infection, une blessure, ou un dommage causé par des substances toxiques. Dans les trois cas, une élévation de la densité hémocytaire (ou hémocytose) a lieu dans le système circulatoire. Les hémocytes sont alors véhiculés par l'hémolymphe vers le site affecté. Ces derniers s'agrègent entre eux pour limiter l'infection ou la lésion (Feng, 1988).
- **La phagocytose** permet l'élimination d'éléments de petite taille tels que les bactéries, les parasites protozoaires et les virus. Ce processus composé de quatre étapes (reconnaissance, attachement, internalisation et dégradation) a été observé dans les hémocytes de plusieurs mollusques (Cheng, 1981).
- **L'encapsulation** intervient lorsqu'une particule est trop volumineuse pour être phagocytée. L'agent pathogène est alors entouré d'une couche cellulaire. La formation de capsules d'origine hémocytaire a été observée chez plusieurs mollusques (Montes *et al.*, 1995; Smolowitz *et al.*, 1998).

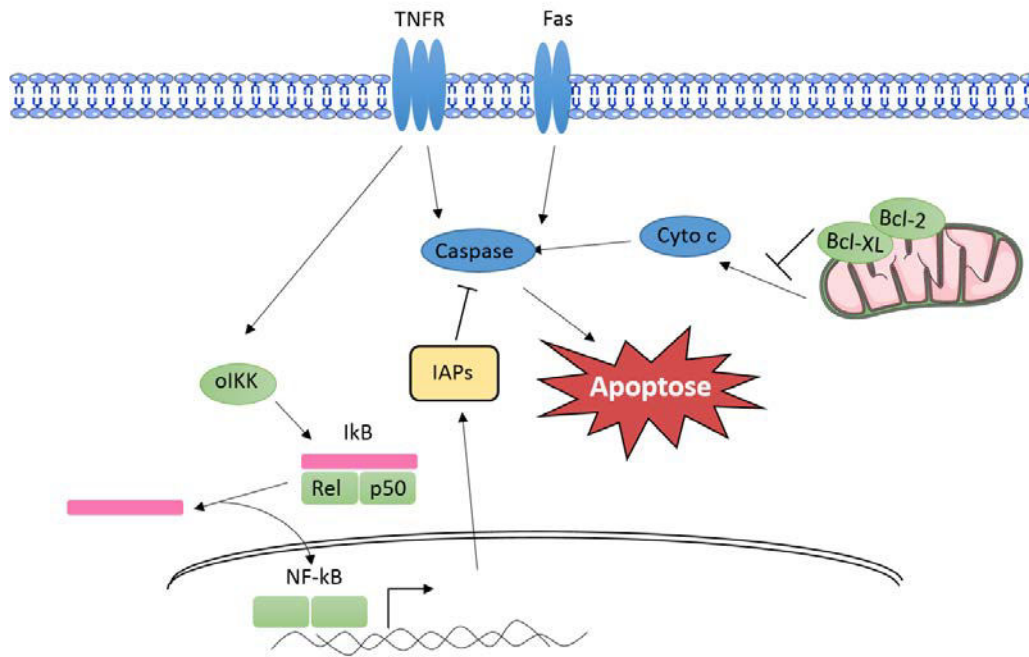


Figure 16: Voie de signalisation cellulaire régulant l'apoptose

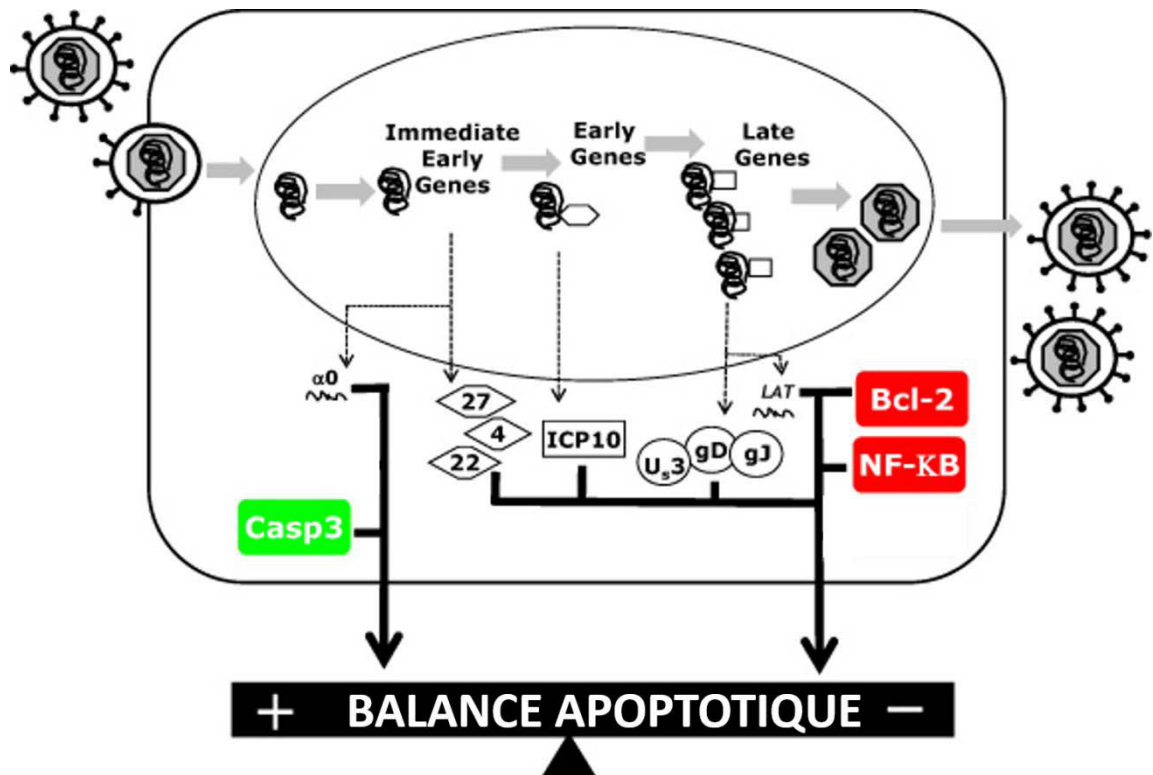


Figure 17: Modulation de la voie apoptotique par le virus HSV-1 (modifié d'après Nguyen and Blaho, 2009)

- **L'apoptose** (MCP) est un mécanisme intervenant dans le but de réguler les populations cellulaires dans un contexte physiologique, mais aussi pathologique. Ce phénomène a été décrit chez plusieurs bivalves marins dont *C. gigas* (Renault *et al.*, 2000a). L'huître creuse, *C. gigas*, possède 48 gènes codant pour des inhibiteurs d'apoptoses contre 8 chez l'homme (Zhang *et al.*, 2012). Cette dernière information suggère que l'apoptose est un mécanisme de défense fondamental chez *C. gigas* et est fortement régulé. Ce phénomène peut cependant toucher tous les types cellulaires et pas uniquement les hémocytes. L'apoptose peut être activée par la voie extrinsèque ou intrinsèque (**Figure 16**, p51). Dans le premier cas, c'est l'activation des récepteurs au TNF et au Fas-ligand qui permettent d'activer l'apoptose via des caspases. Cette activation est également rétro-contrôlée par la voie NF-kB. La voie intrinsèque fait quant à elle intervenir la mitochondrie. La libération du cytochrome C par la mitochondrie active l'apoptose. Cette libération est régulée par les gènes Bcl-2 et Bcl-XL. Chez l'homme, les gènes Bcl-XI et Bcl-2 interagissent avec les protéines « reticulum » et contribuent alors à favoriser l'apoptose. Jouaux *et al.* (2013) ont observé que l'expression du gène reticulum est inhibée chez les animaux infectés, suggérant une inhibition de l'apoptose de l'hôte par le virus OsHV-1. De plus, certains virus tels que les herpèsvirus sont capables de moduler l'apoptose de l'hôte. Chez les herpèsvirus simplex, des gènes très précoces peuvent avoir un effet pro-apoptotique. A l'inverse, un certain nombre de gènes exprimés précocement et tardivement sont capables d'inhiber l'apoptose (ICP4, ICP22, ICP27, ICP10, Us3, gD, gJ) (Nguyen et Blaho, 2009) (**Figure 17**, p51). Les ARN viraux LATs transcrits pendant la phase de latence inhiberaient également l'apoptose des cellules neuronales, favorisant ainsi la survie des cellules infectées et par conséquent la persistance du virus dans son hôte (Perng *et al.*, 2000). Le virus OsHV-1 code pour quatre protéines inhibitrices d'apoptose (IAP). Ceci laisse penser que ce virus serait capable de manipuler l'apoptose de l'hôte.
- **L'ARN interférence.** Bien que la voie de l'ARN interférence n'ait jamais été décrite chez *C. gigas*, elle est probablement un élément naturel important de la réponse antivirale chez les invertébrés. Ce mécanisme de défense, gène spécifique, correspond à une extinction post-transcriptionnelle des ARN double brin (ARNdb). Il se déroule

en deux étapes : une étape d'initiation et une étape effectrice. Au cours de la phase d'initiation, l'enzyme Dicer, qui présente une forte affinité pour les ARNdb, clive les ARNdb en multiples de 21-23 nucléotides. Au cours de la phase effectrice, les homoduplex d'ARN sont incorporés et dégradés au sein du complexe RISC (RNA induced silencing complex). Ce phénomène de défense naturelle essentiellement dirigé contre les virus a été observé chez les plantes, les insectes et les mammifères.

Très récemment, la découverte de miRNA (microRNA, **Annexe 2**, p273) chez *C. gigas* (Xu *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014) tend à supposer que les mécanismes d'ARN interférence sont utilisés chez ce mollusque. Cette découverte pourrait permettre de mieux comprendre la nature des interactions hôte-virus. Il existe chez les crevettes, un mécanisme immunitaire reposant sur la voie de l'ARN interférence (Robalino *et al.*, 2005). Ces auteurs tendent à démontrer l'intérêt de l'ARN interférence comme moyen de lutte contre des maladies virales chez la crevette.

- **L'autophagie** a pour rôle principal le maintien de l'homéostasie en dégradant et recyclant continuellement des composants cytoplasmiques. Une autre fonction essentielle de l'autophagie chez les eucaryotes supérieurs est d'éliminer les protéines potentiellement nocives pour protéger les cellules. L'autophagie permettrait aux cellules de se défendre contre des agents pathogènes présents dans le cytoplasme. Très récemment, les travaux de Moreau *et al.* (soumis à Journal of Autophagy) démontrent la présence de gènes conservés chez *C. gigas* tels que le gène ATG impliqué dans la voie de l'autophagie. Ces mêmes auteurs montrent que l'autophagie est induite durant une infection par OsHV-1.

IV.1.B. La réponse immunitaire innée à médiation humorale

La réponse immunitaire innée à médiation humorale fait également intervenir des molécules dans le but de lutter contre des agents pathogènes, des contaminants ou encore des toxines.

- Les **enzymes hydrolytiques** (phosphatases acide et alcaline, lysozyme, lipase, sérine protéase, amylase, β -glucuronidase) sont présentes à l'intérieur des cellules ou dans l'hémolymphe (plasma) sous forme libre. Elles sont impliquées dans la dégradation des organismes infectieux (Xue et Renault, 2000).
- Les **protéines de stress** (ou HSP pour heat shock proteins en anglais) sont produites en réponse à un stress biotique ou abiotique (polluant, température ou salinité). Elles interviennent également lors de blessures, d'infections et d'expositions à des molécules toxiques.
- Le système **pro-phénoloxydase/phénoloxydase** (proPO) correspond à la cascade biochimique responsable de l'activation des phénoloxydases (PO). En effet, chez les invertébrés, la PO est présente sous forme inactive, la proPO. La phénoloxydase activée catalyse la réaction de conversion de substances phénoliques en mélanine ; les composés intermédiaires de cette réaction sont bactéricides et interviennent dans les phénomènes de reconnaissance du non-soi (Söderhäll et Cerenius, 1998). Des travaux ont mis en évidence des activités PO présentes dans les hémocytes chez *C. gigas* (Hellio *et al.*, 2007). Ces activités exercent un effet antibactérien sur les bactéries pathogènes de *C. gigas* (Luna Acosta, 2010).
- Les **inhibiteurs de protéases** permettent d'éviter l'activation excessive de cascades protéolytiques endogènes (sérines) intervenant dans l'activation du système proPO. Ils peuvent inhiber des protéases qui permettent aux agents pathogènes de pénétrer et de se multiplier au sein de l'hôte. Chez *C. gigas*, des gènes codant pour des protéines de type α -2-macroglobuline, des serpins et des TIMP (Tissue inhibitor of metalloproteinase) ont été rapportées (Gueguen *et al.*, 2003; Montagnani *et al.*, 2001; Renault *et al.*, 2011).

- **L'oxyde nitrique synthétase** (NO synthase) peut catalyser la production d'oxyde nitrique. Ce dernier intervient comme un agent antibactérien ou anti-tumoral. Ce processus de défense a été décrit chez *C. gigas* (Arumugan *et al.*, 2000).
- Les **enzymes antioxydantes** peuvent intervenir lorsqu'un agent pathogène est phagocyté via l'activation du métabolisme oxydatif des cellules phagocytaires. L'activation de l'enzyme membranaire NADPH-oxydase conduit à l'augmentation de la production de radicaux libres. Ces radicaux sont impliqués dans la destruction microbienne par des effets toxiques (Babior, 1984). Chez *C. gigas*, un effet inhibiteur des capacités métaboliques oxydatives a été mis en évidence après incubation des hémocytes avec des produits extracellulaires de *V. aesturianus*, révélant un effet cytotoxique de ces bactéries (Labreuche *et al.*, 2006).
- Les **molécules cytotoxiques, antivirales** et les **peptides antimicrobiens** font également parties de la réponse immunitaire innée chez les bivalves marins. Chez les mollusques bivalves, plusieurs peptides antimicrobiens ont été caractérisés notamment chez les moules *Mytilus galloprovincialis* et *M. edulis* (Charlet *et al.*, 1996; Mitta *et al.*, 2000, 1999a, 1999b). Ces travaux ont permis de mettre en évidence quatre groupes de peptides cationiques riches en cystéine et présentant des ponts disulfures : les myticines, les mytilines, les mytimicines et les défensines. Chez *C. gigas*, la purification des peptides antimicrobiens conduite sur l'hémolymph a permis l'identification d'un peptide dont la structure de type antibiotique (bloquant la croissance des bactéries) laisse présager une origine bactérienne (Defer, 2009). Un peptide antimicrobien de type défensine a également été identifié chez *C. gigas* (Gueguen *et al.*, 2003). Des travaux rapportent une activité antivirale contre le virus de la mosaïque du tabac (VMT) dans des extraits de moule (*M. edulis*), de clam (*Mercenaria mercenaria*) et d'huître creuse (*C. gigas*) (Li *et al.*, 1968, 1965; Limasset, 1961; Li et Traxler, 1972). (Olicard *et al.* (2005b) ont également démontré un effet antiviral de l'hémolymph de *C. gigas* sur le virus HSV-1 et NPI (Necrose pancreatic infection).

A ce jour, aucun interféron n'a été identifié chez *C. gigas*. Un gène présentant des homologues avec le gène IFI44 humain a été identifié chez *C. gigas* (Renault *et al.*, 2011). Des fragments de séquence obtenus à partir d'huîtres plates (*O. edulis*) (Morga *et al.*, 2011), d'huîtres creuses (*C. gigas*) (Gavery et Roberts, 2012) et de moules (*M.*

edulis) (Philipp *et al.*, 2012) semblent avoir une forte homologie avec le facteur de régulation de l'interféron (IRF). Le gène Mx, gène impliqué dans la cascade de l'interféron des vertébrés, a été signalé dans un gastéropode (*Haliotis discus discus*) (De Zoysa *et al.*, 2007).

IV.2 Réponse immunitaire adaptative chez *Crassostrea gigas* ?

La réponse immunitaire spécifique, adaptative ou acquise a été évoquée chez les invertébrés. En effet, la présence de récepteurs spécifiques comme les PRP (pathogen recognition proteins) (Rowley and Powell, 2007) et l'identification du phénomène de sensibilisation (priming en anglais) suggèrent la présence d'une réponse spécifique et d'un phénomène de mémoire chez les invertébrés. La sensibilisation correspond à une augmentation de la réponse d'alerte suite à l'exposition répétée à une situation stimulante. Sire et coll. (1998) ont montré que des gastéropodes (*Biomphalaria glabrata*) infectés par un ver plat parasite (*Schistosoma mansoni*) ne pouvaient pas être réinfectés une seconde fois. Cependant, les bases de cette mémoire n'ont pas encore été élucidées.

V. Organisation du manuscrit

Dans le contexte des épisodes de mortalité massive d'huîtres creuses observés dans différentes régions du monde et associés à la présence du virus OsHV-1, il apparaît indispensable de mieux connaître le cycle de réplication du virus et les mécanismes de défense mis en jeu par les animaux. D'une manière générale, peu de travaux sont consacrés à l'étude de l'immunité chez *Crassostrea gigas* et OsHV-1 (Fleury et Huvet, 2012; Jouaux *et al.*, 2013; Normand *et al.*, 2014; Renault *et al.*, 2011). De même, seulement deux études ont été réalisées dans le but de suivre des gènes viraux (Burge et Friedman, 2012; Renault *et al.*, 2011).

Le manuscrit est organisé en quatre chapitres :

Le chapitre 1 est consacré à la recherche d'ARN messagers viraux chez *C. gigas* au cours d'infections expérimentales. Pour cela, 39 transcrits viraux ont été recherchés par PCR en temps réel chez du naissain d'huître creuse et des primo-cultures de cellules cardiaques. La localisation d'ARN a également été étudiée par hybridation *in situ*.

Le chapitre 2 concerne l'étude des différences en matière de transcriptome pour des gènes viraux et cellulaires chez des familles d'huîtres creuses *C. gigas* présentant des sensibilités contrastées à l'infection à OsHV-1.

Le chapitre 3 est consacré à la modulation de la sensibilité des huîtres creuses au stade naissain, suite à une infection virale par une approche d'ARN interférant.

Le chapitre 4 concerne l'infection virale et les huîtres *C. gigas* au stade adulte. Des essais en pathologie expérimentale ont été réalisés chez des huîtres adultes et le suivi d'expression de gènes viraux et cellulaires a été réalisé. L'activité antivirale de l'hémolymphe d'huîtres creuses adultes a été testée vis-à-vis d'un herpesvirus humain, HSV-1, en utilisant des cellules Véro.

CHAPITRE 1 : RECHERCHE D'ARNM VIRAUX : DETECTION ET LOCALISATION



Le premier chapitre de cette thèse est consacré à la détection et la localisation d'ARNm viraux chez l'huître creuse, *C. gigas*, au cours d'une infection expérimentale par le virus OsHV-1.

Dans un premier temps, deux approches ont été utilisées pour la détection d'ARNm viraux : une approche *in vivo* et une approche *in vitro*. Dans le cadre de l'approche *in vivo*, la démarche scientifique a consisté à rechercher des ARN viraux au cours d'une infection par OsHV-1 chez l'huître creuse au stade naissain après injection de matériel infectieux. En effet, des travaux ont permis de développer un système reproductible permettant d'induire la maladie en conditions expérimentales chez des individus de moins d'un an (Schikorski *et al.*, 2011b). Le mode d'infection par injection et non par cohabitation a été utilisé dans un souci de synchronisation de l'infection virale entre les individus (tous les individus reçoivent la même dose de virus à un instant t). Ces résultats sont présentés dans l'**article 1** de la première partie de ce chapitre (page 64, Transcriptomic study of 39 ostreid herpesvirus 1 genes during an experimental infection, Journal of Invertebrate Pathology, 2014). Dans le cadre de l'approche *in vitro*, les ARNs viraux ont été recherchés, par PCR en temps réel, sur des primo-cultures de cellules cardiaques d'huîtres creuses après un contact avec une suspension virale.

Un travail de recherche de localisation d'ARN et d'ADN viraux a été également réalisé chez l'huître creuse au stade naissain. Les résultats obtenus sont présentés dans l'**article 2** de la seconde partie de ce chapitre (page 99, Detection and distribution of ostreid herpesvirus 1 in experimentally infected Pacific oyster spat, soumis à Virus Research, août 2014).

Comme nous le soulignons dans l'état de l'art, ce travail a pu être effectué dans la mesure où le génome d'OsHV-1 a été entièrement séquencé et qu'il est disponible depuis 2005 (accession number : AY509253.2). Le virus compte 124 ORFs et environ 65% des protéines virales ne présentent aucune homologie dans les banques de données. Dans un premier temps, il semblait indispensable de déterminer si de nouveaux domaines ou de nouvelles fonctions étaient identifiables depuis le travail d'annotation du génome en 2005. Ainsi, les 124 régions codantes du virus ont été analysées grâce à différents logiciels (ExPASy protein, Signal P, Prosite Scan), permettant de prédire de nouveaux domaines et/ou nouvelles fonctions. Ce travail n'a pas permis d'identifier de nouvelles homologies entre OsHV-1 et d'autres modèles.

I. Est-il possible de détecter des ARNm viraux au travers d'une approche de PCR en temps réel ?

I.1 Recherche *in vivo* d'ARN viraux chez des huîtres creuses *Crassostrea gigas*, au stade juvénile

La première démarche a été de sélectionner des gènes viraux dans le but de les suivre par PCR en temps réel. Pour cela, 39 gènes ont été retenus sur la base de leurs fonctions, de leurs domaines, ou de leur appartenance à un groupe décrit dans la littérature (Davison *et al.*, 2005). L'ensemble de ces gènes peut être réparti en cinq groupes:

- (i) le groupe 1 est constitué de dix gènes viraux codant pour des enzymes ou des protéines ayant des domaines connus et impliqués principalement dans la réplication virale (ORF 7, ORF 20, ORF 24, ORF 27, ORF 34, ORF 49, ORF 67, ORF 75, ORF 100 and ORF 109),
- (ii) le groupe 2 regroupe quatre gènes viraux décrits comme étant des inhibiteurs d'apoptose (ORF 42, ORF 87, ORF 99, ORF 106),
- (iii) le groupe 3 correspond à huit gènes présentant un domaine RING finger protein (ORF 9, ORF 38, ORF 53, ORF 96, ORF 97, ORF117, ORF 118, ORF 124),
- (iv) le groupe 4 est constitué de dix gènes codant pour des protéines membranaires putatives (ORF 16, ORF 25, ORF 41, ORF 54, ORF 68, ORF 72, ORF 77, ORF 84, ORF 103 and ORF 111),
- (v) enfin, le dernier groupe comprend sept gènes codant pour des protéines de fonctions inconnues (ORF 4, ORF43, ORF47, ORF 57, ORF64, ORF81 and ORF 86).

L'expression d'ARNm viraux ayant été peu étudiée chez OsHV-1 (Renault *et al.*, 2011 ; Burge et Friedman, 2012), un travail préliminaire de choix des amorces ciblant les gènes viraux a été entrepris. La standardisation de ces couples d'amorces a également été une étape primordiale dans la mise au point d'une PCR en temps réel.

La recherche de transcrits pour ces 39 gènes a été réalisée à 0 h, 2 h, 4 h, 18 h, 26 h and 42 h après infection par injection d'une suspension virale.

Pour la première fois, des transcrits viraux ont été suivis au cours d'une cinétique d'infection. L'analyse de ces gènes révèle la possibilité de détecter certains transcrits viraux au stade précoce de l'infection, dès 2 heures. Une variabilité interindividuelle a été observée durant cette étude. En effet, les gènes viraux ne semblent pas s'exprimer de la même façon dans les premiers stades d'infection et cela suivant les individus. Cependant, il est à noter que des transcrits sont détectables pour l'ensemble des gènes viraux suivis à partir de 18 h post infection.

L'ensemble de ces travaux est présenté dans l'**article 1** (Transcriptomic study of 39 ostreid herpesvirus 1 genes during an experimental infection, Journal of Invertebrate Pathology, 2014, 119, 5-11).

Journal of Invertebrate Pathology
June 2014, Volume 119, Pages 5–11
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2014.03.002>
© 2014 Published by Elsevier Inc.

Archimer
<http://archimer.ifremer.fr>

Transcriptomic study of 39 ostreid herpesvirus 1 genes during an experimental infection

Amélie Segarra^a, Nicole Faury^a, Jean-François Pépin^b, Tristan Renault^{a,*}

^a Ifremer (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer), Unité Santé, Génétique et Microbiologie des Mollusques (SG2M), Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins (LGPMM), Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France

^b Ifremer, Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais (LERPC), Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France

*: Corresponding author : Tristan Renault, tel.: +33 5 46 76 26 26 ; fax: +33 5 46 76 26 11 ;
email address : Tristan.Renault@ifremer.fr

Abstract:

Massive mortality outbreaks have been reported in France since 2008 among Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, with the detection of a particular OsHV-1 variant called μ Var. Virus infection can be induced in healthy spat in experimental conditions allowing to better understand the disease process, including viral gene expression.

Although gene expression of other herpesviruses has been widely studied, we provide the first study following viral gene expression of OsHV-1 over time. In this context, an *in vivo* transcriptomic study targeting 39 OsHV-1 genes was carried out during an experimental infection of Pacific oyster spat. For the first time, several OsHV-1 mRNAs were detected by real-time PCR at 0 h, 2 h, 4 h, 18 h, 26 h and 42 h post injection. Several transcripts were detected at 2 h post infection and at 18 h post infection for all selected ORFs. Quantification of virus gene expression at different times of infection was also carried out using an oyster housekeeping gene, Elongation factor.

Developing an OsHV-1-specific reverse transcriptase real time PCR targeting 39 viral gene appears a new tool in terms of diagnosis and can be used to complement viral DNA detection in order to monitor viral replication.

ACCEPTED MANUSCRIPT

1. Introduction

Herpesviruses are widely distributed among vertebrates and have been also reported in invertebrates. A herpesvirus, called ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1), has been identified in different bivalve species causing massive mortality outbreaks especially in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, larvae and spat (Garcia et al., 2011; Segarra et al., 2010; Arzul et al., 2001 ;(Renault et al., 1994; Arzul et al., 2001; Segarra et al., 2010; Garcia et al., 2011). In this context, tools have been developed such as immunohistochemistry (Le Deuff et al., 1995), *in situ* hybridization (Lipart and Renault, 2002; Renault and Lipart, 1998), polymerase chain reaction (Renault et al., 2000; Renault and Lipart, 1998) and quantitative polymerase chain reaction (Pepin et al., 2008) in order to detect OsHV-1. The virus genome was completely sequenced (GenBank accession number AY509253) and encodes at least 124 genes (Davison et al., 2005). However, more than 70% genes encode putative proteins presenting no homology with proteins from databases (Davison et al., 2005).

Many *in vitro* studies have been performed in order to define virus gene transcription for several mammalian herpesviruses using chemicals including cycloheximide, as inhibitors of gene expression (Rubins et al., 2008; Honess and Roizman, 1975, 1974). Currently, no bivalve cell lines are available and no *in vitro* studies of OsHV-1 gene expression can be performed. Despite these constraints, 2 studies reported OsHV-1 gene expression targeting a single virus gene, ORF4 (protein of unknown function) (Renault et al., 2011) or ORF 100 (DNA polymerase) (Burge and Friedman 2012).

ACCEPTED MANUSCRIPT

Recently, techniques including reverse transcription real time PCR, microarray or RNAseq have been used to study virus gene expression (Beurden et al., 2013; Rossetto et al., 2013; Tombácz et al., 2009; Rubins et al., 2008). In view of the low number of genes encoded by the virus, we selected the RT-qPCR technique to confirm OsHV-1 mRNA presence. For the first time, 39 OsHV-1 mRNAs were studied and detected in Pacific oyster spat during an experimental infection (0, 2, 4, 18, 26, and 42 hours post injection). Relative expression was also performed on viral genes detected at all times. Thus, 8 viral genes were analysed using a host housekeeping gene. For this purpose, the stability of four commonly used housekeeping genes in real time quantitative gene expression studies was first determined in *C. gigas* spat challenged by OsHV-1.

ACCEPTED MANUSCRIPT

2. Material and methods

2.1. Animals

A pool of Pacific oysters *Crassostrea gigas* 7 month old was used in the present study. Oysters were produced in March 2011 at Ifremer facilities in La Tremblade (Charente Maritime, France) during the course of the Bivalife EU funded project (FP7, n° 266157, 2011-2014).

2.2. Defining mortality kinetics in experimentally infected Pacific oysters

Forty oysters were "anaesthetized" during 4 h in a solution containing magnesium chloride (MgCl_2 , 50 g/L) in seawater (1 v)/ distilled water (4 v) (Namba et al., 1995). In order to perform a maximum of sampling the first day post infection and before mortality, several dilutions of a viral suspension at $1.5 \cdot 10^6$ copies of viral DNA/ μL were tested: $1.5 \cdot 10^6$, $5 \cdot 10^4$ (1/25) or $1.2 \cdot 10^3$ (1/125) copies of viral DNA/ μL . Based on mortality records (data not shown), 100 μL of a OshV-1 (μVar genotype, (Segarra et al., 2010)) suspension at $1.2 \cdot 10^3$ copies of viral DNA/ μL were injected into the adductor muscle. Then, of 20 oysters using a 1 mL syringe (Schikorski et al., 2011) and placed in a tank with 5 L of filtered seawater (1 μm) at 22 °C. The bacterial content of the viral suspension was tested before each challenge by plating on Marine agar. A negative control consisted of 20 oysters intra-muscularly injected with 100 μL of sterile artificial seawater and placed in another tank.

Mortality was monitored during 90 hours after injection and percentages of cumulative mortality were daily defined for both conditions (oysters infected with

ACCEPTED MANUSCRIPT

OsHV-1 or injected with sterile artificial seawater). Dead oysters were removed from tanks during the time course of the experiment. The experiment was performed successively 3 times.

2.3. Studying housekeeping genes and virus gene expression in OsHV-

1 experimentally infected Pacific oysters: experimental design

One hundred and twenty oysters were first "anesthetized" during 4 h as previously described. One hundred μ L of viral suspension were injected into the adductor muscle of 60 oysters. A negative control consisted of 60 oysters intra-muscularly injected with 100 μ L of sterile artificial seawater. Sixty negative control oysters were then randomly distributed in 3 tanks and 60 experimentally infected oysters placed in 3 other tanks supplied with 5L of filtered seawater (1 μ m) at 22°C.

Several sampling times were determined based on previously defined mortality kinetics after experimental virus infection. The sampling points were 0 h, 2 h, 4 h, 18 h and 26 h post injection before mortality occurred and at 42 h post injection during mortality outbreak. At each time and for each condition, 3 oysters were collected in each tank (9 individuals per time/condition) and 2 pieces of mantle were sampled from each individual. A piece of mantle (50 to 100mg) was disposed in a tube containing 1 mL of TRIZOL® Reagent™ (Ambion®) and frozen at -80 °C for further RNA extraction. Another piece of mantle was directly frozen at -20 °C for further total DNA extraction. Mantle was selected in the present study for real time RT PCR analysis as this organ has already been showed as a site of interest for viral DNA detection (Schikorski et al., 2011; Sauvage et al., 2009; Arzul et al., 2002).

2.4. DNA extraction

ACCEPTED MANUSCRIPT

Total DNA extraction was performed from a mantle fragment from each collected sample. The DNA extraction was performed with QiAamp tissue mini kit® (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol. Elution was performed in 100 µL of buffer AE provided in the kit.

2.5. Total RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted using TRIZOL® Reagent™ (Ambion®) according to the manufacturer's recommendation. Total RNA was treated with Turbo™ DNase (Ambion®) to remove genomic DNA. The RNA quality and quantity were determined using NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) and Bioanalyser 2100 (Agilent). First-strand cDNA synthesis was carried out using the SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) using 8000 ng of RNA treated. A No RT was performed after each DNase treatment using real time PCR in order to control absence of oyster and/or virus genomic DNA.

2.6. Real time PCRs and relative expression

Real time quantitative PCR was performed in duplicate using a Mx3000 Thermocycler sequence detector (Agilent). All forward and reverse primers used in the present study were designed using primer3 software (Koressaar and Remm, 2007; Untergasser et al., 2012) and synthesised by Eurogentec. Using the same biological material the detection and quantification of OsHV-1 DNA was first carried out using a previously published real time PCR protocol (Pepin et al., 2008). In a second step, real time quantitative RT PCR was used in order (i) to select and validate a suited oyster housekeeping gene from *Crassostrea gigas* spat during OsHV-1 experimental infection and (ii) to study viral gene expression. Amplification

ACCEPTED MANUSCRIPT

reactions were performed in a total volume of 20 μ L to study oyster housekeeping genes and viral gene expression. Each well contained 5 μ L of cDNA dilution (1/30), 10 μ L of Brilliant® SYBR® Green III PCR Master Mix (Agilent), 2 μ L of each primer (3 μ M) and 1 μ L of distilled water. Real time PCR cycling conditions were as follow: 3 min at 95 °C, followed by 40 cycles of amplification at 95 °C for 5 s, 60 °C for 20 s. Melting curves were also plotted (55-95 °C) in order to ensure that a single PCR product was amplified for each set of primers. In all cases negative controls (without cDNA) were included to rule out DNA contamination.

Concerning selection of a suited oyster housekeeping gene, the expressed sequence tags (EST) of 4 candidate genes were obtained from a subtracted cDNA library of *C. gigas* and four primer pairs were designed (Table 1). Individual samples of infected or non-infected oyster spat were collected and analysed at 0 h, 2 h, 4 h, 18 h, 26 h and 42 h post infection.

To study virus gene expression, 39 genes were selected based on protein functions or structures of related proteins among the 124 ORFs of OsHV-1 (Davison et al., 2005) and belongs to 5 groups/families of genes (Figure 1). (i) The first group consisted of 7 ORFs encode unknown proteins (ORF 4, ORF43, ORF47, ORF 57, ORF64, ORF81 and ORF 86) whose 2 ORFs already used to differentiate virus specimens (Renault et al., 2012; Segarra et al., 2010), (ii) 10 genes encoding enzymes or proteins presenting known viral domains (ORF 7, ORF 20, ORF 24, ORF 27, ORF 34, ORF 49, ORF 67, ORF 75, ORF 100 and ORF 109), (iii) one family of Ring-finger genes with 8 members (ORF 9, ORF 38, ORF 53, ORF 96, ORF 97, ORF117, ORF 118, ORF 124), (iv) one family of genes predicted to encode membrane proteins (with 10 members: ORF 16, ORF 25, ORF 41, ORF 54, ORF 68, ORF 72, ORF 77, ORF 84, ORF 103 and ORF 111), (v) one family whose products

ACCEPTED MANUSCRIPT

were related to inhibitors of apoptosis (four members containing BIR domains: ORF 42, ORF 87, ORF 99, ORF 106) (Table 2). Thirty-nine specific primer pairs were designed on a unique gene sense or antisense and validated by real time PCR (Table 2). Standard curves were performed for each primer pair using serial dilutions of total DNA and PCR efficacy ($E=10^{(-1/\text{slope})}$) was calculated thanks to these curves (Rasmussen, 2001). Relative expression was performed using ORFs detected at all times. Thus, 8 viral ORFs were normalized using the selected oyster housekeeping gene of *Crassostrea gigas*, EF (GenBank, Accession No. AB122066) identified as the most stable one in the present study. Infected individuals collected at 2 h post-infection were used as calibrators. The relative quantification value (ratio R) was calculated using the method described by Pfaffl, 2001: $R = [(E_{\text{target}})^{\Delta CT_{\text{target}}(\text{control-sample})}] / [(E_{\text{EFa-1}})^{\Delta CT_{\text{EFa-1}}(\text{control-sample})}]$. All amplification obtained by real time PCR was validated by sequencing using the PRISM® 3130 XL-Avant Genetic Analyzer with a 36 cm capillary array and POP 7 polymer (data not shown).

2.7. Data analysis

CTs were calculated with the Stratagene Mxpro software 4.0. To determine the expression stability of housekeeping gene candidates 2 excel applets were used, *Genorm* (Vandesompele et al., 2002) and *Normfinder* (Andersen et al., 2004). These programs calculate the gene expression normalization factor and determine the most stable internal controls. *Genorm* algorithm assumed that expression variation of the ratio of two ideal reference genes is identical in all samples. Based on pairwise variation of reference candidate genes, the stability measure (M value), which reflects instability in expression levels of one gene, is calculated. M values < 1.5 are considered as stable reference genes. The main goal of the *Normfinder* program is to determine the expression stability of candidate references for all samples according

ACCEPTED MANUSCRIPT

to their intra- and inter-group variation. *NormFinder* provides a direct measure for expression variation of each gene under a given set of experimental conditions. Based on this algorithm, genes with the lowest average expression stability values will be top ranked.

Results for relative expression for the 8 selected ORFs were expressed as mean $\pm$ standard error. A Mann-Whitney test was used to analyze OsHV-1 gene expressions between each time. Correlations between the viral DNA detection and the viral transcript detection were tested with the Spearman's nonparametric rho (Rs) using XLSTAT software (version 2013).

ACCEPTED MANUSCRIPT

3. Results

Pacific oysters injected with the OshV-1 suspension demonstrated high mortality rates in the 3 experiments (Figure 2), whereas oysters injected with sterile artificial seawater showed no mortality (Figure 2). The cumulative mortality rate reached 10.5% at 42 hours post injection, 40.8% after 66 hours and 63% at the end of the experiments (90 hours). Virus DNA quantification was performed for each individual collected during one experiment. No virus DNA was detected in control oysters. The first detection of virus DNA was observed 2 hours post injection. Individual OshV-1 DNA amounts ranged from 0 to 7.5, 0 to 5×10^1 , 2.3×10^3 to 2.1×10^5 , 1.7×10^1 to 1×10^6 and 1×10^3 to 1.2×10^6 DNA copies per ng of total DNA at 2 h, 4 h, 18 h, 26 h and 42 h pi respectively (Figure 3).

The relative expression level of 4 oyster genes was studied over mantle tissue during the experimental infection of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, by OshV-1. Thus, the most popular tools of *Genorm* and *Normfinder* were used to aid the selection of suitable reference gene from among the candidates. Those two programs evaluate gene expression stability using different algorithms and consider genes with low expression stability values to be more stably expressed than those with high values. According M values, ranking from the least to the most stable one out of the 4 genes was as follows: Actin (M= 0.87), GAPDH (M=0.71), L5 (M= 0.6) and EF (M=0.6) with *Genorm* (data not shown). Stability index were follows: Actin (0.63), GAPDH (0.4), L5 (0.38) and EF (0.29) with *Normfinder* (data not shown). Thus, the most stable gene reported was EF with the lowest value from both softwares.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Based on protein functions, structures and on families genes described by Davison et al. (2005), 39 ORFs belonging to 5 groups/families of genes were selected in this study (Figure 1). Although viral transcripts of some OshV-1 ORFs were detected by real time RT PCR in few individuals as soon as 2 h and 4 h pi at low quantities, viral transcripts were mainly quantifiable from 18 h pi. More precisely, 18 viral transcripts were detected in few individuals at 2 h (ORF 4, ORF 16, ORF 20, ORF 24, ORF 25, ORF 34, ORF 38, ORF 42, ORF 43, ORF 49, ORF 53, ORF 57, ORF 72, ORF 75, ORF 81, ORF 87, ORF 99 and ORF 106) and 16 ORFs at 4h (ORF 20, ORF 24, ORF 25, ORF 27, ORF 43, ORF 57, ORF 67, ORF 72, ORF 86, ORF 87, ORF 96, ORF 100, ORF 106, ORF 109, ORF 111 and ORF 117) in all groups (Figure 4). Moreover, the DNA viral quantity was correlated with each viral transcript during the experimental infection ($R_s = 0.81$, ± 0.1 , $p < 0.0001$).

Only the apoptosis inhibitor group (BIR with four members: ORF 42, ORF 87, ORF 99 and ORF 106) has all genes detected 2 h pi in a few of individuals (Figure 5).

A relative expression analysis was performed for ORFs detected at each time of collection. Thus, 8 virus genes were selected. They belong to 4 groups/families: (i) unknown proteins with ORF 43 and ORF 57, (ii) enzyme group with ORF 20 and ORF 24, (iii) membrane protein group with ORF 25 and ORF 72 and, (iv) apoptosis inhibitors with ORF 87 and ORF 106 (Figure 6). No ORFs belonging to ring finger protein groups were detected at all times. Eight genes presented a relative expression significantly different between 4 h pi and 18 h pi ($p = 0.05$). At 4 h pi, ORF 24 and ORF 25 were down regulated compared at 2 h pi. After this time, all ORFs were up regulated, especially ORF 87. However, the expression level between 18, 26 and 42 h pi were variable. ORF 72 was more expressed at 18 h pi compared at 26 and 42 h pi. Nevertheless, the relative expressions of these 8 ORFs were not significantly different between 18, 26 and 42 h pi.

ACCEPTED MANUSCRIPT

4. Discussion

High mortality rates and viral DNA detection in Pacific oyster spat after intramuscular injection confirmed active virus replication in experimentally infected animals as previously reported (Schikorski et al., 2011). In the present study we selected injection protocol rather than cohabitation in order to contaminate all animals at the same time. To study viral gene expression, animals were mainly collected before mortality occurred in order to detect viral transcripts as early as possible and to avoid degradation of such transcripts in dead or dying individuals.

Our study is the first to demonstrate OshV-1 RNA detection early after exposure. Main differences in terms of RNA detection between virus genes were observed at 2 and 4 h pi. Moreover, virus transcripts were detected from 18 h pi for the 39 genes monitored in this study. This result was correlated with virus DNA quantity detected by real time PCR with high amounts detected from 18 h pi.

A few of studies were previously reported on OshV-1 gene expression. The first detection of viral RNA was reported for the ORF 4 (unknown protein) in juveniles and adult oysters 48 h post-infection (Renault et al., 2011). Another study was performed based on ORF 100 (viral DNA polymerase) transcripts (Burge and Friedman, 2012). Burge and Friedman (2012) detected viral mRNA on day 1 and showed that DNA polymerase expression increased during the early days of infection in *Crassostrea gigas* larvae. Here, ORF 100 transcripts were detected at 18 h post-infection in oyster spat. DNA polymerase is essential for the replication of viral genomes during herpesvirus infections. Previous studies of the transcript of HSV-1 DNA polymerase gene (UL30) have classified it as a E gene (early gene) (Wobbe et al., 1993; Yager and Coen, 1988). Recently, Beurden et al. (2013) studied the genome-wide gene

ACCEPTED MANUSCRIPT

expression of anguillid herpesvirus 1 and reported that DNA polymerase (ORF 55) was also classed as an early gene. Apoptosis inhibitor genes (ORF 42, ORF 87, ORF 99 and ORF 106) were also detected as early as a 2 h post infection in a few of individuals. Typically, apoptosis inhibitors contain one or more BIR domains and often a carboxy-terminal Ring finger. Ring finger proteins have been shown to play a key role in transregulatory functions in vertebrate herpesviruses (Cohen and Nguyen, 1998; Moriuchi et al., 1994). The Ring finger domain of ICP0 and homologs from alphaherpesviruses are required for the activation of quiescent genomes blocking silencing of viral DNA (Everett et al., 2010; Gu and Roizman, 2009). Ince et al. (2008) showed that CIV Apoptosis inhibitor should be classified as an immediate-early CIV gene.

A major concern regarding viral gene expression is the choice of an internal reference gene control. Several studies on viral gene expression used a host gene as an internal control (Tombácz et al., 2009; Liu and Yang, 2005). The four selected housekeeping genes are involved in ribosomal metabolism (L5), cytoskeleton structure (Actin), protein metabolism (GAPDH) and elongation factor (EF), respectively. These genes are frequently used as housekeeping genes in mollusks (Du et al., 2013; Morga et al., 2010; Siah et al., 2008). Both algorithms gave EF gene as the most stable housekeeping gene when *Crassostrea gigas* spat were challenged by OsHV-1. EF1 was among the most frequently used housekeeping genes in several marine species (Morga et al., 2010; Araya et al., 2008). However, other housekeeping genes of interest have been also identified in *C. gigas* depending of experimental designs (Du et al., 2013; Green and Montagnani, 2013). The validation of EF as housekeeping gene allowed the study of viral expression genes by the relative expression method. The 8 ORFs detected at each time were selected

ACCEPTED MANUSCRIPT

and their relative expression was not significantly different between 18, 26 and 42 h pi, this result could be explained by a rapid cycle of replication of OsHV-1. As other herpesviruses, OsHV-1 could be able to replicate in less than 24 hours (Reichelt et al., 2009; Smith and Harven, 1973). ORF 87 (belonging to Apoptosis inhibitor group) was especially up regulated after 4 h pi. This result suggests an important role of IAPs in virus replication and disease development. IAPs may help the virus to limit the cellular apoptotic response.

Currently, it was not possible to affiliate the 39 OsHV-1 ORFs according to categories (immediate early, early or late genes) as described widely in vertebrate herpesvirus. Nevertheless, this study also demonstrates that OsHV-1 is able to replicate at 2 h pi in oyster spat based on RNA and DNA detection.

Finally, detection of a few of virus mRNAs before 18 h post-injection may also suggest a limit of the use of the real time RT PCR technique. As this technique targeted a particular gene, it is important to mention that the number of copies for a particular transcript could be lower than the number of copies of viral DNA in an animal at a particular collection time. Moreover, no precise information is available at a cellular level concerning viral replication sites. Mantle was selected in the present study for real time RT PCR analysis as it has already been showed as a site of viral DNA detection (Schikorski et al., 2011; Sauvage et al., 2009; Arzul et al., 2002). However, some differences in terms of genes expression could exist depending of targeted tissues or cells. Finally, similarly to virus DNA detection, an inter-individual variability of viral gene expression was observed between oysters for a same time point. Such differences could be partly explained by susceptibility differences between individuals. The use of bi-parental oysters as a source of infected material

ACCEPTED MANUSCRIPT

could be more appropriate to study the expression of OsHV-1 genes in *C. gigas*. An approach is in progress in the laboratory.

Conclusions

We studied the detection and expression kinetics of 39 OsHV-1 genes by real-time PCR at 0 h, 2 h, 4 h, 18 h, 26 h and 42 h post infection. For the first time, OsHV-1 mRNAs were detected during the early hours of infection and more precisely at 2, 4 and 18 h pi. Viral RNA detection by real-time PCR could be an additional tool in order to acquire a better understanding on the viral cycle, viral gene expression and spread of the virus. Although the results reported in the present study suggest that some OsHV-1 genes are expressed at 2h further studies are needed to complete these first results.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Acknowledgement

The authors wish to thank the Ifremer laboratory team in La Tremblade for the production of Pacific oysters and more precisely to L. Degremont, D. Tourbiez and P. Haffner. We also want to thank A. Travers for the helpful input in her review of this paper. This work was supported by the EU funded project Bivalife (PF7, n° 266157), the project MOLTRAQ (ERA NET EMIDA) and the Region Poitou-Charentes.

ACCEPTED MANUSCRIPT

- Andersen, C.L., Jensen, J.L., Ørntoft, T.F., 2004. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res.* 64, 5245–5250.
- Araya, M.T., Siah, A., Mateo, D., Markham, F., McKenna, P., Johnson, G., Berthe, F.C.J., 2008. Selection and evaluation of housekeeping genes for haemocytes of soft-shell clams (*Mya arenaria*) challenged with *Vibrio splendidus*. *J. Invertebr. Pathol.* 99, 326–331.
- Arzul, I., Renault, T., Lipart, C., 2001. Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves: demonstration of interspecies transmission. *Dis. Aquat. Organ.* 46, 1–6.
- Arzul, I., Renault, T., Thébault, A., Gâlard, A., 2002. Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Res.* 84, 151–160.
- Beurden, S.J., Peeters, B.P., Rottier, P.J., Davison, A.J., Engelsma, M.Y., 2013. Genome-wide gene expression analysis of anguillid herpesvirus 1. *BMC Genomics* 14, 83.
- Burge, C.A., Friedman, C.S., 2012. Quantifying Ostreid Herpesvirus (OsHV-1) Genome Copies and Expression during Transmission. *Microb. Ecol.* 63, 596–604.
- Cohen, J.I., Nguyen, H., 1998. Varicella-zoster virus ORF61 deletion mutants replicate in cell culture, but a mutant with stop codons in ORF61 reverts to wild-type virus. *Virology* 246, 306–316.
- Davison, 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.
- Du, Y., Zhang, L., Xu, F., Huang, B., Zhang, G., Li, L., 2013. Validation of housekeeping genes as internal controls for studying gene expression during Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) development by quantitative real-time PCR. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 939–945.
- Everett, R.D., Boutell, C., McNair, C., Grant, L., Orr, A., 2010. Comparison of the Biological and Biochemical Activities of Several Members of the Alpha herpesvirus ICP0 Family of Proteins. *J. Virol.* 84, 3476–3487.
- Garcia, C., Thébault, A., Dégremont, L., Arzul, I., Miossec, L., Robert, M., Chollet, B., François, C., Joly, J.-P., Ferrand, S., Kerdudou, N., Renault, T., 2011. Ostreid herpesvirus 1 detection and relationship with *Crassostrea gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. *Vet. Res.* 42, 73.
- Green, T.J., Montagnani, C., 2013. Poly I:C induces a protective antiviral immune response in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against subsequent challenge with Ostreid herpesvirus (OsHV-1 μ var). *Fish Shellfish Immunol.* 35, 382–388.
- Gu, H., Roizman, B., 2009. The Two Functions of Herpes Simplex Virus 1 ICP0, Inhibition of Silencing by the CoREST/REST/HDAC Complex and Degradation of PML, Are Executed in Tandem. *J. Virol.* 83, 181–187.
- Honess, R.W., Roizman, B., 1974. Regulation of Herpesvirus Macromolecular Synthesis I. Cascade Regulation of the Synthesis of Three Groups of Viral Proteins 1. *J. Virol.* 14, 8–19.
- Honess, R.W., Roizman, B., 1975. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: sequential transition of polypeptide synthesis requires functional viral polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 1276–1280.
- Koressaar, T., Remm, M., 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23, 1289–1291.
- Le Deuff, R.M., Renault, T., Cochenne, N., 1995. Antibodies specific for channel catfish virus cross-react with Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, herpes-like virus. *Vet. Res.* 26, 526–529.
- Lipart, C., Renault, T., 2002. Herpes-like virus detection in infected *Crassostrea gigas* spat using DIG-labelled probes. *J. Virol. Methods* 101, 1–10.
- Liu, X., Yang, F., 2005. Identification and function of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a dUTPase. *Virus Res.* 110, 21–30.
- Morga, B., Arzul, I., Faury, N., Renault, T., 2010. Identification of genes from flat oyster *Ostrea edulis* as suitable housekeeping genes for quantitative real time PCR. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 937–945.

ACCEPTED MANUSCRIPT

- Moriuchi, H., Moriuchi, M., Cohen, J.I., 1994. The RING Finger Domain of the Varicella-Zoster Virus Open Reading Frame 61 Protein Is Required for Its Transregulatory Functions. *Virology* 205, 238–246.
- Namba, K., Kobayashi, M., Aida, S., Uematsu, K., Yoshida, M., Kondo, Y., Miyata, Y., 1995. Persistent relaxation of the adductor muscle of oyster *Crassostrea gigas* induced by magnesium ion. *Fish. Sci.* v. 61(2) p. 241–244.
- Pepin, J.F., Riou, A., Renault, T., 2008. Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *J. Virol. Methods* 149, 269–276.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Reichelt, M., Brady, J., Arvin, A.M., 2009. The Replication Cycle of Varicella-Zoster Virus: Analysis of the Kinetics of Viral Protein Expression, Genome Synthesis, and Virion Assembly at the Single-Cell Level. *J. Virol.* 83, 3904–3918.
- Renault, T., Cochenec, N., Le Deuff, R.-M., Chollet, B., 1994. Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 14, 64–66.
- Renault, T., Faury, N., Barbosa-Solomieu, V., Moreau, K., 2011. Suppression subtractive hybridisation (SSH) and real time PCR reveal differential gene expression in the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, challenged with Ostreid herpesvirus 1. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 725–735.
- Renault, T., Le Deuff, R.-M., Lipart, C., Delsert, C., 2000. Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *J. Virol. Methods* 88, 41–50.
- Renault, T., Lipart, C., 1998. Diagnosis of herpes-like virus infections in oysters using molecular techniques. Presented at the Aquaculture and water : fish culture, shellfish culture and water usage.
- Renault, T., Moreau, P., Faury, N., Pepin, J.-F., Segarra, A., Webb, S., 2012. Analysis of Clinical Ostreid Herpesvirus 1 (Malacoherpesviridae) Specimens by Sequencing Amplified Fragments from Three Virus Genome Areas. *J. Virol.* 86, 5942–5947.
- Rossetto, C.C., Tarrant-Elorza, M., Verma, S., Purushothaman, P., Pari, G.S., 2013. Regulation of Viral and Cellular Gene Expression by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Polyadenylated Nuclear RNA. *J. Virol.* 87, 5540–5553.
- Rubins, K.H., Hensley, L.E., Bell, G.W., Wang, C., Lefkowitz, E.J., Brown, P.O., Relman, D.A., 2008. Comparative Analysis of Viral Gene Expression Programs during Poxvirus Infection: A Transcriptional Map of the Vaccinia and Monkeypox Genomes. *PLoS ONE* 3, e2628.
- Sauvage, C., Pépin, J.F., Lapègue, S., Boudry, P., Renault, T., 2009. Ostreid herpes virus 1 infection in families of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during a summer mortality outbreak: Differences in viral DNA detection and quantification using real-time PCR. *Virus Res.* 142, 181–187.
- Schikorski, D., Renault, T., Saulnier, D., Faury, N., Moreau, P., Pépin, J.-F., 2011. Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. *Vet. Res.* 42, 27.
- Segarra, A., Pépin, J.F., Arzul, I., Morga, B., Faury, N., Renault, T., 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res.* 153, 92–99.
- Siah, A., Dohoo, C., McKenna, P., Delaporte, M., Berthe, F.C.J., 2008. Selecting a set of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in normal and tetraploid haemocytes of soft-shell clams, *Mya arenaria*. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 202–207.
- Smith, J.D., Harven, E. de, 1973. Herpes Simplex Virus and Human Cytomegalovirus Replication in WI-38 Cells I. Sequence of Viral Replication. *J. Virol.* 12, 919–930.
- Tombácz, D., Tóth, J., Petrovski, P., Boldogkői, Z., 2009. Whole-genome analysis of pseudorabies virus gene expression by real-time quantitative RT-PCR assay. *BMC Genomics* 10, 491.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, e115–e115.

ACCEPTED MANUSCRIPT

- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, research0034.1–research0034.11.
- Wobbe, K.K., Digard, P., Staknis, D., Coen, D.M., 1993. Unusual regulation of expression of the herpes simplex virus DNA polymerase gene. *J. Virol.* 67, 5419–5425.
- Yager, D.R., Coen, D.M., 1988. Analysis of the transcript of the herpes simplex virus DNA polymerase gene provides evidence that polymerase expression is inefficient at the level of translation. *J. Virol.* 62, 2007–2015.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Figure caption

Figure 1: Distribution of OsHV-1 genes according 5 putative protein groups: Unknown proteins, Enzymes, Ring finger proteins, Membrane proteins and Apoptosis inhibitors. Colors represent the OsHV-1 gene percentage, black and black shades denote 39 ORFs selected in this study and all ORFs of OsHV-1 respectively. These groups were described previously by Davison et al., 2005.

Figure 2: Percent cumulative mortality of *Crassostrea gigas* spat after injection challenge with OsHV-1. Bars represent SD of experimental infections (n=3).

Figure 3: Virus DNA detection by real time quantitative PCR in oyster spat after intramuscular injection with OsHV-1. (Error bars represent SD, n=9 individuals at each collection time).

Figure 4: Heatmap illustrating 39 viral gene transcripts at 2 h, 4 h, 18 h, 26 h and 42 h by real time PCR. Colors represent the infected individual percentage, green and red denote no and all individuals positive respectively (n=9 individuals analysed at each collection time).

Figure 5: Histogram of detection mRNA viral in 1/CT for all infected samples for ORFs belonging apoptosis inhibitors family A: ORF 42, B: ORF 87, C: ORF 99 and D: ORF 106) in *Crassostrea gigas* during experiment trial. Bars represent SD (n=2). (n=9 individuals analysed at each collection time).

ACCEPTED MANUSCRIPT

Figure 6: Relative expression of the 8 viral gene transcripts (normalized to EF) in *Crassostrea gigas* mantle after infection with OsHV-1 using time 2 h pi as calibrator. Values are means of three replicates and bars represent SE (n= 9). *Mann Whitney test ($p<0.05$).

Figure 1

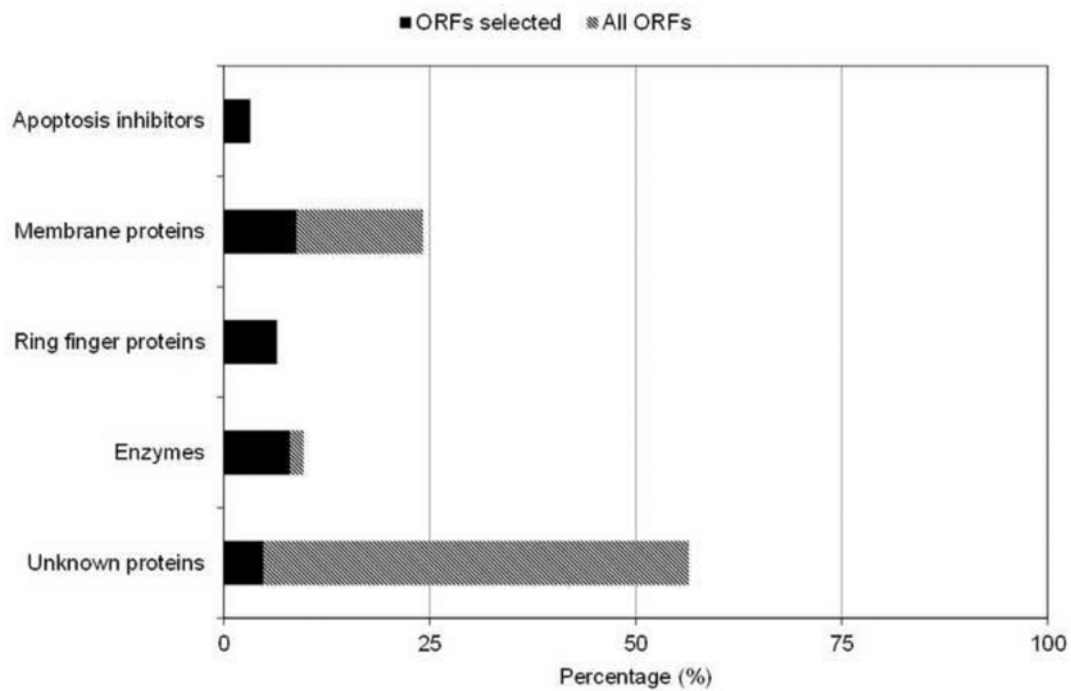


Figure 2

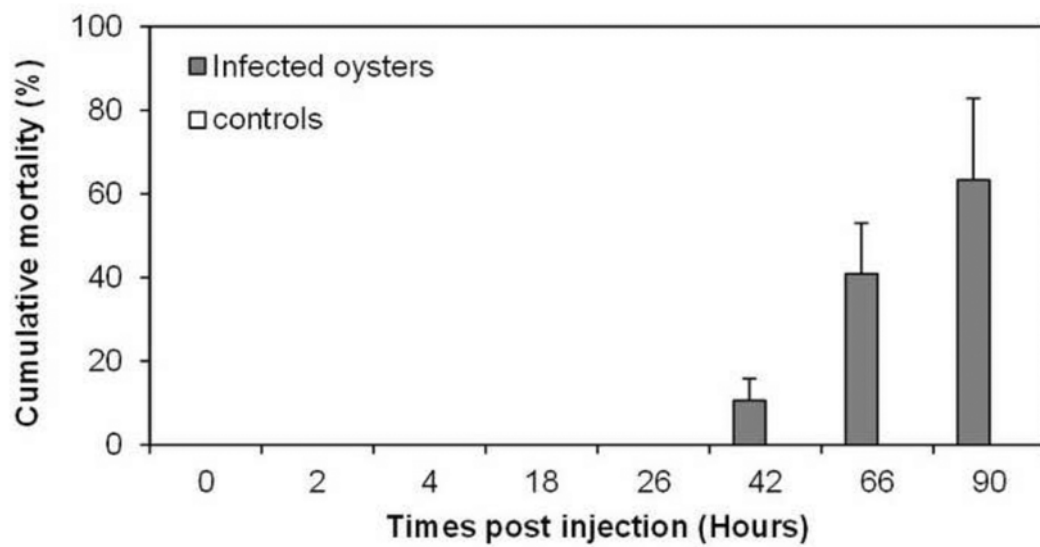


Figure 3

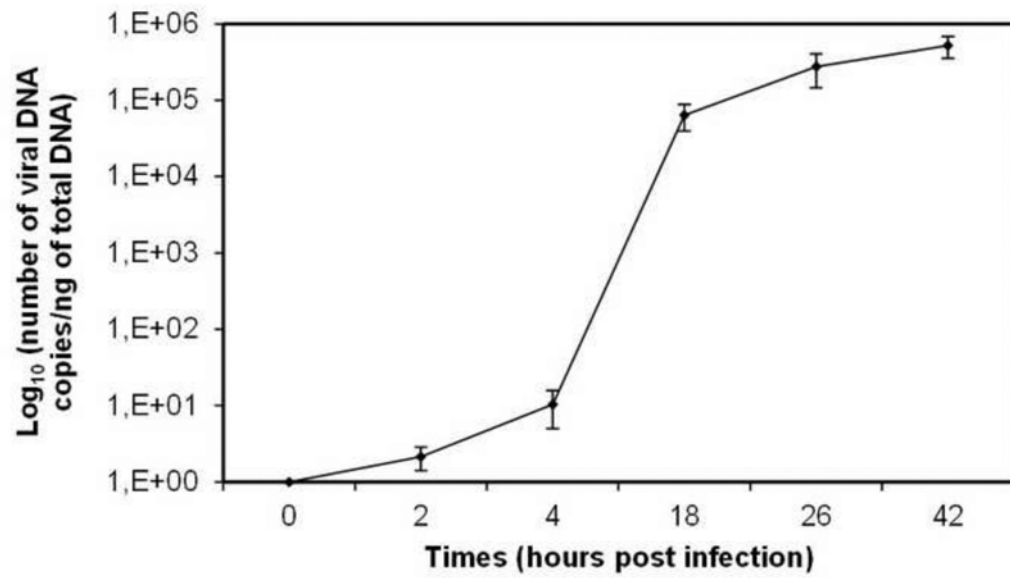


Figure 4

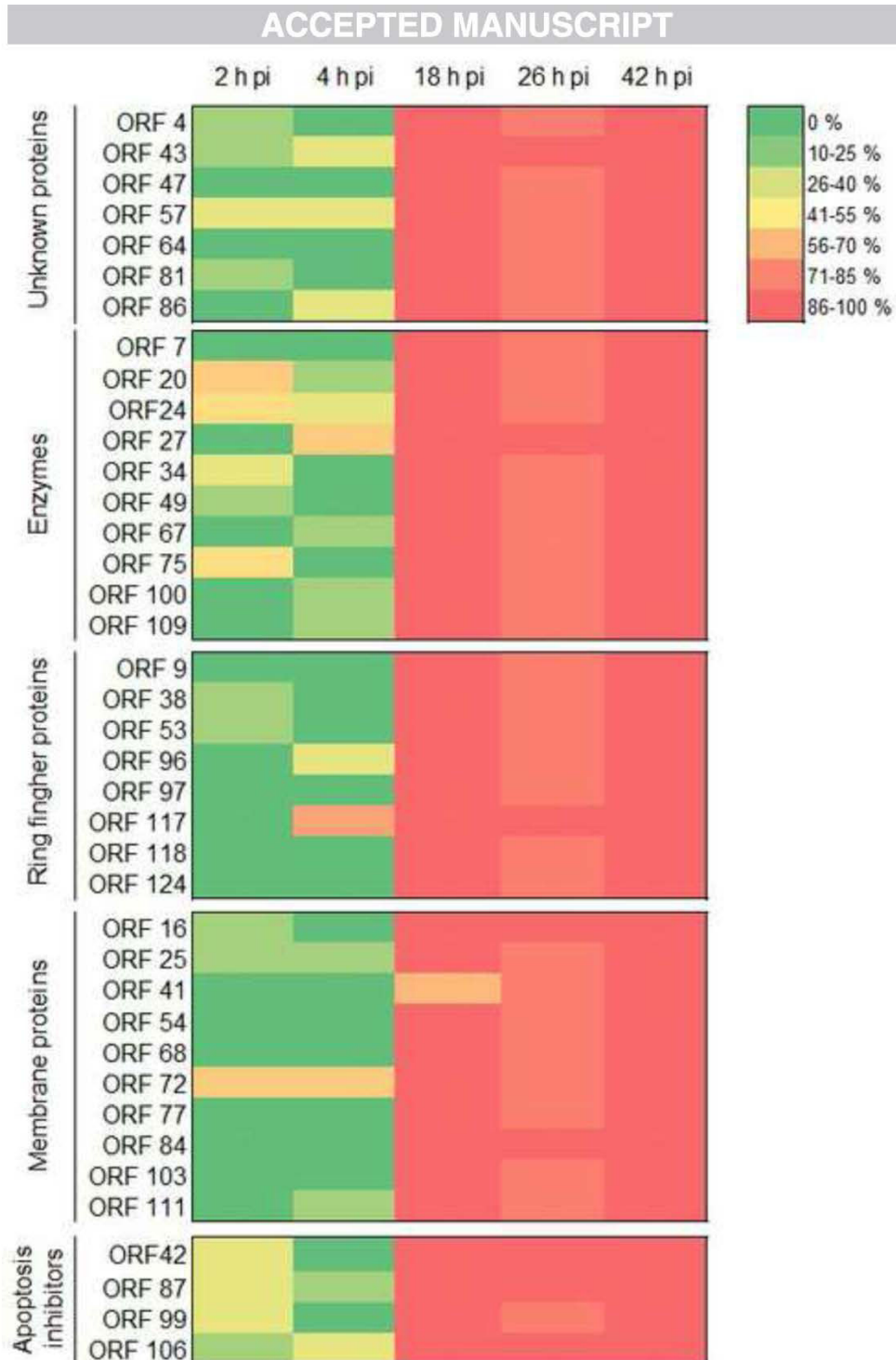


Figure 5

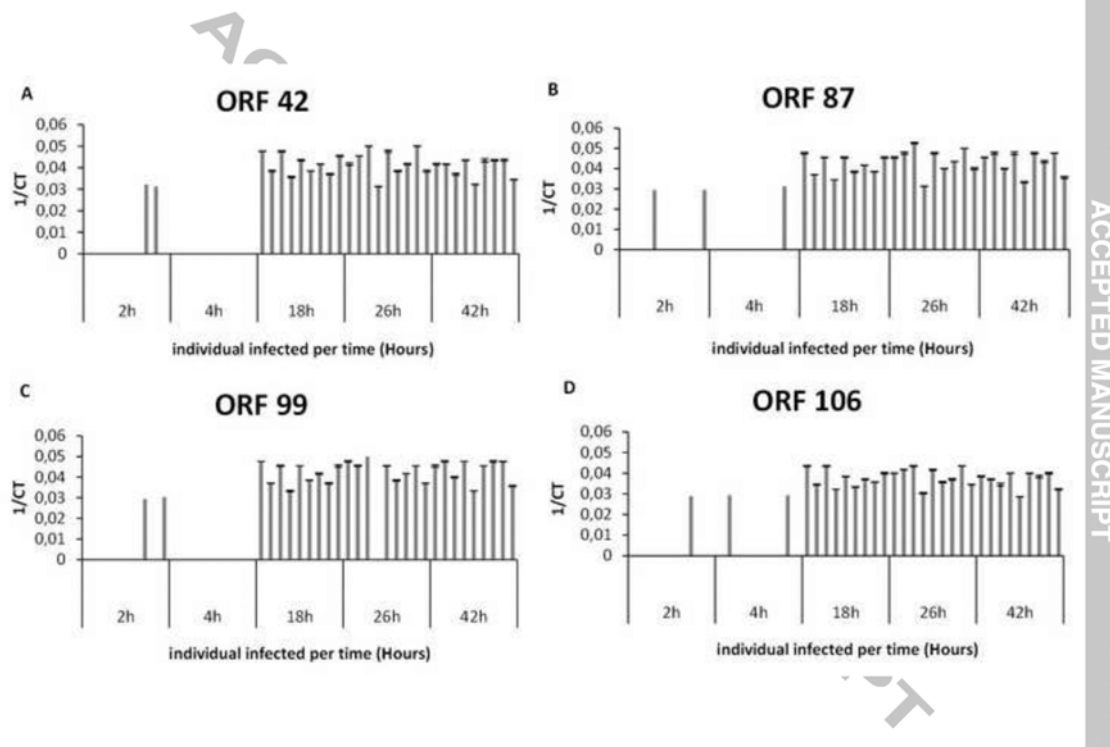
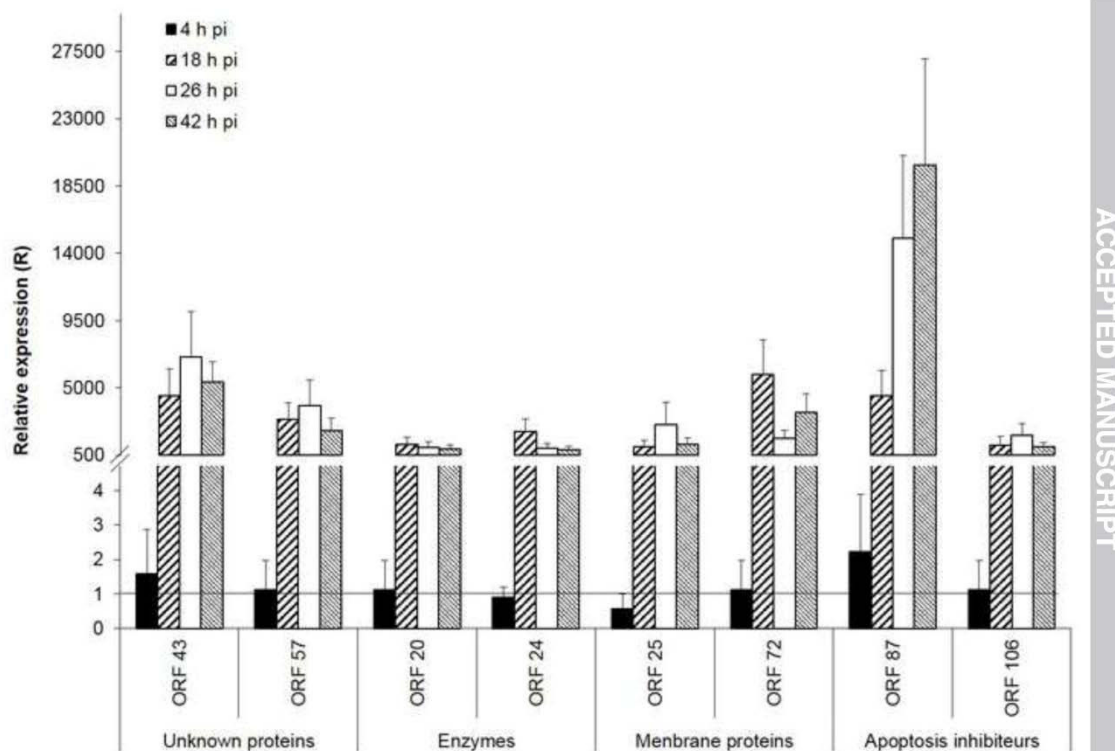


Figure 6



ACCEPTED MANUSCRIPT

Table 1: Candidate genes housekeeping selected

Gene name	Accession number	Function	Forward	Reverse	Amplicon (bp)	Efficiency (%)
Actin	FJ669295	Cytoskeleton structure protein	CACCAACTGGGATGACATGG	AGGGACAGTACGGCCTGGAT	198	97.5
Elongation factor 1-alpha (EF)	AB122066	Translation eukaryotic factor	AGTCACCAAGGCTGCACAGAAAG	TCCGACGTATTTCTTTGCGATGT	200	98.8
Glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase (GAPDH)	AJ544886	Glycolytic enzyme	CATCATCTCTGCCCCCTCAG	TGGCTGTGTACGCATGGAAT	194	96.8
Ribosomal protein (L5)	AJ563456	Ribosome subunit	CCCATGAGCTGCCTCGATAC	GCACCTGAATGCACCTGGTT	194	97

ACCEPTED MANUSCRIPT

Table 2: 39 Open Reading Fragments (ORFs) selected among 124 ORFs of OsHV-1.

ORFs	Forward	Reverse	Efficiency (%)	Amplicon (bp)	Protein
ORF4	tacaccggcctcttcagga	cgaattgtcactgccaca	96.1	217	Unknown protein
ORF7	cgatagcgaggagacgatg	ccgtgtgttcattctgcaa	100.8	198	Primase(Enzyme)
ORF9	ccatctcgttggggtaaat	cgtggcatgtgagcagagag	98.9	189	Ring finger protein
ORF16	tocaaaccagaccagcctt	ccaaagacgagccagggtta	102.4	148	Membrane protein
ORF20	ctggctgttgcatttcc	agacagcggaaggatgatg	97.8	213	Ribonucleotide reductase small subunit
ORF24	cgcacaaatgctctcttc	tggaaatgaggagccatga	98.6	200	Primase (Enzyme)
ORF25	ctgcacaaagtcgtatcca	ccacaagggtgaattccatgtt	98.7	200	Membrane protein
ORF27	accgccatggtgctaattc	cctgcaaggccaagtatgga	97	189	dUTPase (Enzyme)
ORF34	cttgacaaatgcatccaaa	tggcaccacattcaagggt	100.7	183	dUTPase (Enzyme)
ORF38	ttttgcatcgtctctgctc	tgcctgtttgcagagaacc	101.5	164	Ring finger protein
ORF41	aacogtltgtccaccattc	acogcagtgcaactccaatc	102	183	Membrane protein
ORF42	gcaggcataacaggtgagca	tgagagcgtgacagggaat	99.9	205	Apoptosis inhibitor
ORF43	tgaggataccagaccagacaa	gttccaaccttgcattcacc	98.8	199	Unknown protein
ORF47	gcgcacaaatggtatggaa	tcttggcaggctctgtgat	98.6	202	Unknown protein
ORF49	acccaaatgctgggggtaa	cggagattgcgggttacca	102.1	191	Helicase (Enzyme)
ORF53	cogaaaaaccaggactgga	tggcgagggaagtagatcgtt	98.5	197	Ring finger protein
ORF54	taacatgggacaccgaagac	acatctcgccgcttgcac	95	193	Membrane protein
ORF57	ttaccagcacgagcaggat	tgcgcgtttatccaacac	99.2	150	Unknown protein
ORF64	glaccaatgtggcagtgacaa	tttgatacgagacggggaag	102	200	Unknown protein
ORF67	gatgacggcattgtgaggt	cctgtgtgcggcttggtta	98.5	195	Helicase (Enzyme)
ORF68	ttgtaccggccattgacat	ggaaacgagtttgcacactt	102.7	185	Membrane protein
ORF72	acctcccgctcaatggtatga	tccaccacccctacaatca	94.7	180	Membrane protein
ORF75	atgatctgcgcactctggt	tgtgcctgaaggatgtgcaa	100	186	dUTPase (Enzyme)
ORF77	cctgattggcagtcggtat	tgcctgtgtgagtgcaag	103.2	189	Membrane protein
ORF81	tggcacagtacagcaccag	agaccocgcacaaacgtctat	95.7	182	Unknown protein
ORF84	catctgtctgtcatctgcca	tgtacacctcgggtgcagtttt	97.6	186	Membrane protein
ORF86	tgaaccagacatggacacacc	cccgacgttatagcccaat	98.0	185	Unknown protein
ORF87	cacagacgacattccacaaa	aaagctcgttccacattggt	98.7	196	Apoptosis inhibitor
ORF96	caccatacgggtgtgtct	tgttgcgagtcattctctgg	100.9	180	Ring finger protein
ORF97	acatcttcccacatgccatc	acgcatgttccagccatacc	103.6	196	Ring finger protein
ORF99	ggtggagggtgctgttgaaa	cogactgacaacccatggac	96.3	200	Apoptosis inhibitor
ORF100	accaggaccacgcttctgat	ccgccttccataaattgg	100.6	197	DNA polymerase
ORF103	gaggcatggcagcaagtg	gctggcttctcgtctggaat	99.9	199	Membrane protein
ORF106	tctggcatcaacctccaaa	tcagcctatgacgagcgaatg	100.8	200	Putative apoptosis inhibitor
ORF109	atggccatgagtgccagat	ccacaacgctgggtatgat	102.3	165	ATPase subunit (Enzyme)
ORF111	cttcttggccaacgcctat	gogttagacattccgacca	104	179	Membrane protein
ORF117	aatttccgcctctgtgct	tgatgacggaagtggaaca	98	200	Ring finger protein
ORF118	coggaaggtcgtcagggtta	caccttcgccaccgtatta	95.7	183	Ring finger protein
ORF124	aagtcagcccaacatgg	actggcagacgtcattggt	98	197	Ring finger protein

I.2 Recherche *in vitro* d'ARN viraux dans des primo-cultures de cellules cardiaques d'huître creuse, *Crassostrea gigas*

I.2.A. Introduction

Il n'existe pas de lignées cellulaires de mollusques marins disponibles actuellement, la seule voie pour tenter d'observer la présence d'ARN viraux en culture cellulaire est l'utilisation de primo-cultures. Le Deuff et coll. (1994) ont développé un protocole permettant d'obtenir des primo-cultures de cellules cardiaques d'huître creuse dans le but d'observer une réplication du virus. En effet, différentes approches (microscopie électronique à transmission et hybridation *in situ*) ont permis d'observer la présence du virus dans le cœur chez les huîtres infectées. Les cellules de type fibroblastique, mais également les cardiomyocytes sont apparus comme des sites de réplication d'OsHV-1. Nous avons donc choisi le modèle de primo-culture de cellules cardiaques afin de rechercher la présence d'ADN et d'ARN viraux.

I.2.B. Matériel et méthodes

I.2.B.a. Primo-cultures de cellules de ventricules cardiaques

La primo-culture de cellules de ventricules cardiaques d'huître creuse, *C. gigas*, a été réalisée d'après les travaux de Le Deuff et coll. (1994). Brièvement, les huîtres adultes provenant d'une écloserie française ont été brossées sous l'eau courante, en prenant soin de nettoyer correctement la jointure des deux valves. Puis, les animaux ont été désinfectés pendant 30 secondes dans un bain d'éthanol 70% et placés sous hotte à flux laminaire pour séchage. Pour chaque expérience, 30 individus adultes (agées de 2 ans) ont été sacrifiés de manière à obtenir un nombre suffisant de cœurs et de cellules. L'ouverture des huîtres a été réalisée à l'aide d'une lame désinfectée flambée. Après ouverture des valves, les animaux ont été rincés avec de l'eau de mer (EM) autoclavée contenant 0,1% de Tween (Tween 20, Sigma), puis avec de l'EM autoclavée. Le ventricule de couleur claire, se distingue des deux oreillettes de couleur brune. Les ventricules ont été prélevés à l'aide d'une pince et d'un scalpel stérilisés et regroupés dans un homogénéiseur de Dounce (type 76-152 μm , OSI) autoclavé. Lorsque tous

les animaux ont été prélevés, les ventricules ont été décontaminés dans une solution d'hypochlorite de sodium pendant 10 min, rincés avec un mélange L15 (milieu de Leibovitz) 3X: EM (1:1), puis dissociés. La dissociation des tissus est double: enzymatique et mécanique. Elle permet d'obtenir une viabilité optimale des cellules. L'action enzymatique a été réalisée grâce à l'ajout d'une solution de trypsine-EDTA (2 g/L Trypsine, 0.4 g/L EDTA, 8 g/L NaCl, 2.7g/L KCL et Na₂HPO₄ 12H₂O, 0.2g/L KH₂PO₄) diluée au huitième dans un mélange L15 3X : EM (1: 1). 800 µL à 1 mL de cette solution sont préconisés par ventricule pour une bonne dissociation. Les ventricules ont été simultanément dissociés au moyen de l'homogénéiseur de Dounce par des « allers-retours ». L'action de la trypsine est inhibée par ajout d'un volume de L15 3X : EM (1:1) supplémenté de 10% de SVF (Serum de Veau Fœtal). Les cellules ont été centrifugées (2500 rpm, 15 minutes, température ambiante) et re-suspendues dans le milieu de culture (L15 3X : EM (1:1)). Chaque flasque traitée recevait 9 mL de suspension cellulaire, ce qui représente environ 5,4 ventricules par flasques de 9 cm². L'incubation a été réalisée à 19°C. Le milieu de culture a été changé dans chaque flasque quotidiennement. Cette opération avait pour objectif d'écarter tout risque de contamination, de stimuler au mieux les cultures primaires et d'éliminer les cellules mortes. L'aspect des cultures a été contrôlé chaque jour sous microscope photonique.

I.2.B.b. Contact des primo-cultures de cellules cardiaques avec une suspension virale

Les cellules cardiaques d'huître ont été mises en contact avec une suspension virale 7 à 8 jours après le début de la mise en culture (lorsque la confluence du tapis cellulaire était supérieure à 50%). Le milieu de culture a d'abord été éliminé des flasques. Trois flasques ont reçu 1 mL de suspension virale à 10⁵ copies d'ADN viral/µL. Six flasques témoins ont été réalisées : trois flasques recevant de l'EM autoclavée et trois flasques contenant 1 mL de la suspension virale filtrée à 0.1µm (pour éliminer les particules virales et mettre les cellules en contact avec les autres composés contenu dans la suspension). Quatre essais ont été réalisés et les cellules ont été infectées avec la même suspension virale (variant µVar). Après un temps de contact de 45 minutes, 5,5 mL de milieu de culture a été ajouté dans chaque flasque. La température d'incubation post-contact était de 19°C. Le suivi des cultures était effectué quotidiennement sous microscope photonique inversé. Les tests ont été réalisés quatre fois, de manière à éprouver la reproductibilité des résultats. En fonction des essais, les cellules ont été récupérées entre 15 heures et 144 heures post infection (**Tableau II**, p94), puis centrifugées

(150 g, 5 minutes, TA) et mis dans des tubes Eppendorf (1,5 ml) contenant 500 µL de Trizol. Les cellules d'une flasque par temps et condition étaient prélevées pour en extraire les ARNs.

I.2.B.c.Extraction des ARNs, synthèse d'ADN complémentaire et RT-PCR

L'ARN total a été extrait en utilisant le réactif TRIZOL®TM (Ambion) selon la recommandation du fabricant. L'ARN total a été traité avec la TurboTM DNase (Ambion) pour éliminer l'ADN génomique. La qualité et la quantité de l'ARN ont été déterminées à l'aide d'un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) et d'un Bioanalyser 2100 (Agilent). La synthèse d'ADNc a été réalisée en utilisant le système SuperScript III[®] First-Strand Synthesis (Invitrogen) en utilisant 8000 ng d'ARN traité. Chaque traitement à la DNase a été contrôlé par PCR en temps réel.

La RT PCR a été utilisée pour étudier la détection des 39 gènes viraux en utilisant le protocole décrit par Segarra *et al.* (2014a, **article 1**) avec 5 µL d'ADNc dilution (1/30).

I.2.C. Résultats et discussion

Quatre essais d'infection *in vitro* ont été réalisés sur des primo-cultures de cellules cardiaques avec une suspension virale contenant le variant µVar dans le but d'induire une multiplication virale et de détecter des ADNc viraux.

Des acquisitions d'image en microscopie photonique ont été réalisées avant et après infection pour l'ensemble des essais, temps et conditions. Cependant, aucune différence visible n'a été observée (**Figure 18**, p94 ; **Tableau II**, p94).

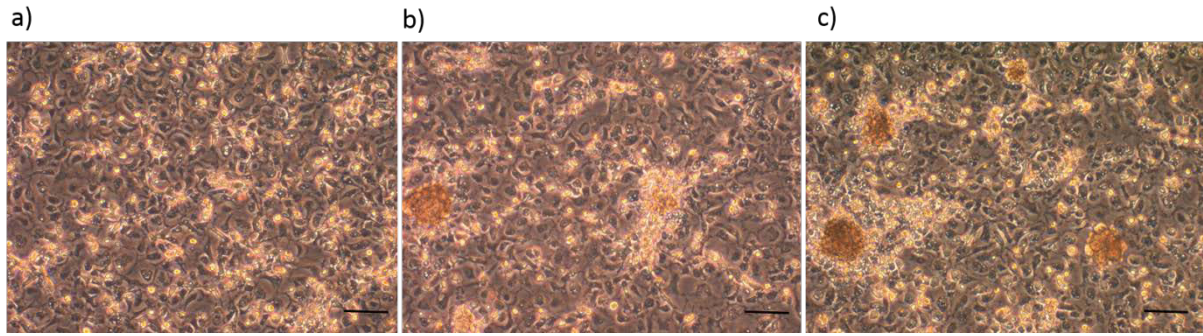


Figure 18: Primo-cultures de cellules cardiaques *C. gigas* à 24 hpi pour l'essai 1, par microscopie photonique. (a) Cellules cardiaques dans une flasque contrôle avec de l'eau de mer 24 hpi, (b) Cellules cardiaques dans une flasque contrôle avec le filtrat de la suspension virale 0.1 µm 24 hpi, (c) Cellules cardiaques dans une flasque contenant la suspension 24 hpi. Barre : 50 µm, grossissement : 40x10

Tableau II : Essais d'infections expérimentales *in vitro* sur des primo-cultures de cellules cardiaques

	Essai 1		Essai 2		Essai 3			Essai 4		
Jours des primo-cultures au moment du contact avec la suspension virale	J8		J8		J8			J7		
Prélèvements (hpi)	15	24	72	144	24	48	72	24	48	72
Observation d'effet cytopathogène (toutes conditions confondues)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

En outre, des PCR en temps réel ont été réalisés à partir de cellules issues de l'essai 1 (pour chaque flasque, chaque condition et chaque temps). Le choix de l'essai (essai 1) a été fait en fonction des temps précoces de prélèvement comparé aux trois autres essais. L'hypothèse étant qu'un grand nombre de transcrits pouvait s'exprimer avant 24 hpi (Segarra *et al.*, 2014a, article 1). Ainsi, les 39 couples d'amorces définis précédemment (cf. article 1, p62) ont été utilisés.

Les témoins EM et filtrat à 0,1µm ne présentaient aucune détection d'ARN viral parmi les 39 gènes suivis. Contrairement aux flasques témoins, les flasques ayant reçu la suspension virale, présentaient de faible quantité d'ARN viral aux différents temps post contact pour 24 ORFs sur 39 (**Tableau III**, p97). L'absence de détection ARN pour les flasques témoins démontre l'absence d'ARN viraux contaminants pouvant être présent dans la suspension virale. Ainsi, les ARN détectés dans les flasques infectés sont bien issus du virus OsHV-1. Néanmoins, les Cts (« Cycle Threshold » ou cycle seuil en français) obtenus par PCR en temps réel sont très élevés et hors limite de quantification (**Tableau III**, p97). Ceci laisse suggérer une réplication virale à bas bruit chez les primo-cultures de cellules cardiaques d'huîtres creuses et cela malgré l'absence d'effet cytopathogène.

En l'état actuel, nos résultats ne permettent pas de conclure sur la réplication virale *in vitro*. Le stade adulte reste plus adéquate que le naissain dans la mesure où (i) le prélèvement du cœur est plus facile et (ii) plus volumineux facilitant ainsi la mise en culture cellulaire (nombre de cellules plus importante). Cependant, il serait intéressant de réaliser les infections *in vitro* sur des animaux plus jeunes. En effet, bien que la détection d'ADN viral ait déjà été décrite chez l'adulte (Arzul *et al.*, 2002; Barbosa-Solomieu *et al.*, 2004), ce stade de développement semble peu ou pas sensible à l'infection virale.

L'état des cellules *in vitro* a également pu être modifié durant les mises en culture. Ceci pourrait expliquer que le virus ne serait plus capable de reconnaître les cellules empêchant ainsi toute infection virale. Il se peut également qu'un mélange de types cellulaires rende plus difficile la multiplication du virus dans les cellules maintenues *in vitro*. Cependant, Le Deuff et coll. (1994) décrivent un effet cytopathogène discret 48 heures après l'infection dans les flasques ayant reçu un inoculum de larves infectées. Cet effet disparaissait totalement cinq à six jours post-infection.

D'autres études devront être entreprises pour tenter de démontrer *in vitro* une réplication virale. Le suivi de l'ADN viral couplé avec de la microscopie électronique à transmission pourrait également être réalisé pour confirmer la présence éventuelle de particules virales ou de protéines virales par immunogold dans les cellules.

Tableau III: Détection d'ARN viral par PCR en temps réel dans des primo-cultures de cellules cardiaques à différents temps et conditions (exemple de l'essai 1). Les Cycles seuils (Cts) sont les données brutes obtenus par PCR en temps réel.

Groupe	ORFs	Limite de quantification (ct max)	Témoin EM		Témoin filtrat		OsHV-1	
			15 hpi	24 hpi	15 hpi	24 hpi	15 hpi	24 hpi
Protéines inconnues	ORF 4	33	*	*	*	*	39	*
	ORF 43	36	*	*	*	*	36	37
	ORF 47	34	*	*	*	*	*	*
	ORF 57	35	*	*	*	*	37	*
	ORF 64	33	*	*	*	*	*	*
	ORF 81	35	*	*	*	*	*	*
	ORF 86	35	*	*	*	*	*	37
Enzymes	ORF 7	33	*	*	*	*	37	33
	ORF 20	35	*	*	*	*	36	35
	ORF 24	32	*	*	*	*	*	*
	ORF 27	33	*	*	*	*	33	35
	ORF 34	32	*	*	*	*	*	*
	ORF 49	36	*	*	*	*	*	37
	ORF 67	36	*	*	*	*	37	*
	ORF 75	32	*	*	*	*	33	34
	ORF 100	33	*	*	*	*	*	*
	ORF 109	35	*	*	*	*	*	*
Protéines Ring finger	ORF 9	32	*	*	*	*	37	37
	ORF 38	33	*	*	*	*	*	*
	ORF 53	35	*	*	*	*	37	*
	ORF 96	33	*	*	*	*	*	*
	ORF 97	32	*	*	*	*	35	*
	ORF 117	34	*	*	*	*	*	34
	ORF 118	32	*	*	*	*	*	*
Protéines membranaires	ORF 124	35	*	*	*	*	*	*
	ORF 16	36	*	*	*	*	36	35
	ORF 25	33	*	*	*	*	34	37
	ORF 41	34	*	*	*	*	*	*
	ORF 54	35	*	*	*	*	*	*
	ORF 68	33	*	*	*	*	37	37
	ORF 72	33	*	*	*	*	38	36
	ORF 77	33	*	*	*	*	*	*
	ORF 84	34	*	*	*	*	38	34
	ORF 103	32	*	*	*	*	*	*
Inhibiteur d'apoptose	ORF 111	33	*	*	*	*	*	36
	ORF 42	33	*	*	*	*	36	*
	ORF 87	32	*	*	*	*	35	36
	ORF 99	30	*	*	*	*	*	32
	ORF 106	36	*	*	*	*	36	*

II. Est-il possible de détecter et localiser des ARNm viraux au travers d'une approche d'hybridation *in situ* chez le naissain d'huître creuse?

Des travaux précédents rapportent une forte détection d'ADN viraux dans le manteau et les branchies (Lipart et Renault, 2002). L'objectif principal de cette étude était de définir s'il en est de même pour les ARN viraux.

Une approche d'hybridation *in situ* a été entreprise chez du naissain d'huîtres creuses. Au cours d'une infection expérimentale, nous avons recherché l'ADN et l'ARN du virus OsHV-1 dans l'ensemble des organes et tissus (manteau, branchies, glande digestive, muscle adducteur, cœur ou encore gonades) sur coupes histologiques. Cette détection a également été appréhendée par l'utilisation de deux doses virales afin de comparer les résultats. Une dose faible et une dose élevée d'une suspension virale (μ Var) ont été testées par injection dans le muscle adducteur. L'intérêt de l'utilisation d'une dose faible résidait dans l'absence de mortalité induite par cette dernière (contrairement à la dose forte) et permettait d'explorer la présence d'ARN viraux chez des animaux infectés ne démontrant pas de mortalité.

Dans cette étude, des transcrits viraux ont pu être détectés uniquement chez les huîtres infectées avec la forte dose. Les ADN et ARN viraux ont été localisés principalement dans le manteau, les branchies, mais également le cœur. Nous suggérons que le cœur pourrait être un site de multiplication virale et jouer un rôle essentiel dans la dissémination du virus au sein de l'organisme.

L'ensemble des résultats de ces travaux est présenté dans l'**article 2** (soumis en août 2014 à Virus Research).

III. Conclusion du chapitre 1

Les travaux rapportés dans ce chapitre visaient à répondre aux questions suivantes :

Q1. Est-il possible de détecter des ADN viraux au travers d'une approche de PCR en temps réel ?

In vivo:

Oui, les résultats montrent une réplication virale lors d'une infection expérimentale chez le naissain. Certains gènes sont détectables dès 2 hpi et principalement des gènes codant pour des enzymes et des inhibiteurs d'apoptose. Il est également intéressant de souligner la détection des 39 gènes viraux chez tous les individus dès 42 hpi alors que tous ne sont pas morts à 90 hpi. Cette information suggère des réponses immunitaires différentes entre individus, mais également que la maladie ne se traduit pas systématiquement par la mort des animaux infectés. Cependant, chez les huîtres l'observation de symptômes reste très difficile et la mortalité est de ce fait le facteur le plus facile à suivre lors d'un processus infectieux. En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence la réplication d'OsHV-1 chez *C. gigas* en condition expérimentale.

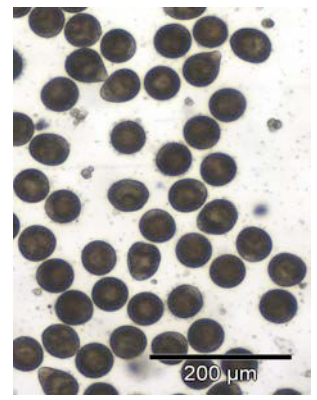
In vitro :

Oui hypothétique, car les quantités d'ARN détectées dans les primo-culture de cellules cardiaques infectées sont très faibles et hors gamme de détection. Néanmoins, cette détection a été observée pour 61 % des ORFs suivis par PCR en temps réel alors qu'aucune détection n'a été rapportée dans les cellules contrôles. En conclusion, nos travaux suggèrent une potentielle réplication à bas bruit en conditions *in vitro*. L'absence de lignées cellulaires homologues reste certainement l'inconvénient majeur rencontré dans l'étude de ce virus. D'autres études seront nécessaires pour valider cette hypothèse.

Q2 Est-il possible de détecter et localiser des ARN viraux au travers d'une approche d'hybridation *in situ* chez le naissain d'huître creuse ?

Oui, les ARN viraux ont été détectés dans plusieurs tissus sur la base d'une approche d'hybridation *in situ*. Ceci prouve que le virus est capable de se multiplier dans différents tissus de l'huître avec la transcription de certains de ses gènes et leur détection. En outre, l'intensité du signal (des ARN viraux) observée par HIS augmente graduellement au cours du temps après injection de la suspension virale. Le manteau, les branchies et le cœur se révèlent comme étant les premiers organes sièges d'une multiplication virale. Les premiers transcrits détectés par HIS, étaient observés à 14 hpi. En fin d'expérimentation (26 hpi), l'ensemble des organes présentait une détection d'ARN viraux par HIS, excepté la gonade. En outre, l'intensité du signal pour la détection des ARN viraux était plus forte dans le cœur à 14 hpi. Cet organe pourrait jouer être un site de réplication précoce et contribuer à la dissémination du virus au sein de l'hôte.

CHAPITRE 2 SENSIBILITES CONTRASTEES A L'INFECTION PAR OsHV-1 : INTERACTIONS *IN VIVO* ENTRE L'HUITRE CREUSE, *CRASSOSTREA GIGAS*, ET LE VIRUS EN CONDITIONS EXPERIMENTALES



Le second chapitre de thèse est consacré à l'étude des interactions entre le virus et l'hôte lors d'infections expérimentales *in vivo*.

Dans un premier temps, l'utilisation de familles d'huîtres creuses infectées en conditions expérimentales a permis d'explorer les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance/sensibilité à l'infection à OsHV-1. La cinétique du niveau d'expression de gènes viraux a été mesurée par PCR en temps réel. Nous nous sommes également intéressés à la réponse de l'hôte en ciblant des gènes potentiellement impliqués dans la réponse immunitaire.

Ce travail est présenté dans la première partie de chapitre 2, **article 3** (page 131, Dual transcriptomics of virus-host interactions: comparing two Pacific oyster families presenting different levels of susceptibility to ostreid herpesvirus 1, BMC Genomics, 2014, two Pacific oyster families presenting different levels of susceptibility to ostreid herpesvirus 1, BMC Genomics, 15(580), 1-13.). Des travaux antérieurs (Sauvage *et al.*, 2010, 2009) avaient en effet permis de montrer que des familles d'huîtres creuses élevées dans les mêmes bassins pouvaient présenter des niveaux de mortalité très différents. La présence de faibles quantités d'ADN viral avaient été révélées par PCR en temps réel chez les animaux présentant de faibles mortalités. A l'inverse, de fortes quantités d'ADN viral avaient été observées chez les individus présentant de fortes mortalités. Ces résultats laissaient suspecter une base génétique à la sensibilité des huîtres à l'infection virale.

Ainsi, dans le cadre d'un projet financé par la Commission Européenne (Bivalife), il a été produit des familles « bi-parentales » (descendances issues du croisement d'une huître mâle et d'une huître femelle) dans les installations d'élevage de l'Ifremer (La Tremblade, France). Ces familles ont été testées en conditions expérimentales pour leur sensibilité à l'infection à OsHV-1. Cette approche a permis d'identifier des familles présentant des mortalités fortes, moyennes ou faibles cinq jours après l'injection de virus OsHV-1 dans le muscle adducteur et de disposer ainsi de matériel biologique contrasté vis à vis de la sensibilité à l'infection virale. Deux familles présentant des mortalités contrastées (faibles et fortes mortalités) à l'infection à OsHV-1 ont été sélectionnées. Ainsi, il était intéressant de comparer les différences de cinétique d'infection virale, de réplication virale et les capacités de réponses immunitaires des deux familles.

La seconde partie de ce chapitre intègre également des **résultats complémentaires** concernant la détection d'ADN viral dans l'eau de mer suite à une injection expérimentale chez des animaux appartenant à deux familles d'huîtres creuses au stade naissain.

Enfin, des larves de seconde génération issues de ces deux familles ont été produites afin d'appréhender la réplication virale à un stade de développement plus précoce que le naissain. L'utilisation de ces larves a également permis d'explorer certains mécanismes moléculaires pouvant être impliqués dans la résistance/sensibilité à l'infection à OsHV-1. Ce travail est présenté dans la troisième partie de ce chapitre, **article 4** (page 152, Viral infection and OsHV-1 RNA detection in larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, soumis à Journal of Invertebrate Pathology, juillet 2014).

I. Est-il possible de mettre en évidence des différences transcriptomiques de gènes viraux et cellulaires chez des familles d'huîtres creuses au stade naissain?

Afin de préciser les interactions entre l'huître creuse et OsHV-1 au sein de familles d'huîtres creuses plus ou moins sensibles à l'infection virale, un travail préliminaire a été effectué dans le but de déterminer la sensibilité de 16 familles : chaque famille a été testée trois fois. Sur la base de ces premiers résultats, les deux familles présentant les comportements les plus contrastées (mortalités cumulées cinq jours après injection d'une suspension virale dans le muscle adducteur des animaux) ont été sélectionnées dans le but d'établir des différences en termes de réponses moléculaires viraux et cellulaires. Ces interactions ont pu être caractérisées par suivi en PCR en temps réel de l'expression de gènes viraux et cellulaires.

Le suivi de l'expression de gènes viraux et cellulaires a été réalisé à 0, 4, 8, 12 et 26 hpi chez les deux familles (A et P) et également à 72 et 144 hpi chez les individus survivants de la famille la moins sensible (famille P).

Cette étude a permis de mettre en évidence une diminution des quantités d'ADN viral détectés au cours du temps chez les animaux survivants de la famille la moins sensible (famille P) alors que cette quantité était en constante augmentation chez les animaux de la famille la plus sensible (famille A présentant 100% de mortalité en fin d'expérience). Le suivi de gènes viraux a montré une différence en termes de niveau d'expression entre ces deux familles. En effet, la totalité des gènes viraux était plus fortement exprimée chez la famille la plus sensible à 26 hpi en comparaison à la famille la moins sensible. Pour la première fois, l'étude des gènes viraux a permis de regrouper des gènes viraux en fonction de leur niveau d'expression (3 classes : gènes faiblement, moyennement et fortement exprimés). Il est à noter que 82% des gènes viraux ont été retrouvés dans les mêmes groupes pour les deux familles.

L'étude de l'expression de gènes cellulaires a également permis d'observer des différences entre les individus appartenant à deux familles suggérant des processus pouvant expliquer la capacité de certaines huîtres à mieux résister à l'infection virale.

Ces résultats contribuent à une meilleure compréhension concernant d'une part, la sensibilité de l'hôte à l'infection virale, notamment en termes de réponse cellulaire et d'autre part, le cycle de multiplication du virus chez différents individus et différentes familles.

Ces travaux sont rapportés dans **l'article 3** (Dual transcriptomics of virus-host interactions: comparing two Pacific oyster families presenting contrasted susceptibility to ostreid herpesvirus 1 ; BMC Genomics, 2014, 15(580), 1-13).

Article 3

Segarra et al. BMC Genomics 2014, 15:580
http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/580



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Dual transcriptomics of virus-host interactions: comparing two Pacific oyster families presenting contrasted susceptibility to ostreid herpesvirus 1

Amélie Segarra¹, Florian Mauduit¹, Nicole Faury¹, Suzanne Trancart¹, Lionel Dégremont¹, Delphine Tourbiez¹, Philippe Haffner¹, Valérie Barbosa-Solomieu¹, Jean-François Pépin², Marie-Agnès Travers¹ and Tristan Renault^{1*}

Abstract

Background: Massive mortality outbreaks affecting Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat in various countries have been associated with the detection of a herpesvirus called ostreid herpesvirus type 1 (OsHV-1). However, few studies have been performed to understand and follow viral gene expression, as it has been done in vertebrate herpesviruses. In this work, experimental infection trials of *C. gigas* spat with OsHV-1 were conducted in order to test the susceptibility of several bi-parental oyster families to this virus and to analyze host-pathogen interactions using *in vivo* transcriptomic approaches.

Results: The divergent response of these oyster families in terms of mortality confirmed that susceptibility to OsHV-1 infection has a significant genetic component. Two families with contrasted survival rates were selected. A total of 39 viral genes and five host genes were monitored by real-time PCR. Initial results provided information on (i) the virus cycle of OsHV-1 based on the kinetics of viral DNA replication and transcription and (ii) host defense mechanisms against the virus.

Conclusions: In the two selected families, the detected amounts of viral DNA and RNA were significantly different. This result suggests that Pacific oysters are genetically diverse in terms of their susceptibility to OsHV-1 infection. This contrasted susceptibility was associated with dissimilar host gene expression profiles. Moreover, the present study showed a positive correlation between viral DNA amounts and the level of expression of selected oyster genes.

Keywords: Interactions, Ostreid herpesvirus 1, Gene expression, Susceptibility, *Crassostrea gigas*

Background

Ostreid herpesvirus type 1 (OsHV-1), the causative agent of major economic losses in the Pacific oyster industry, is a member of the family *Malacoherpesviridae* from the order *Herpesvirales* [1,2]. It was in particular identified as the main cause of the massive mortality outbreaks of *C. gigas* spat recently reported in Europe, Australia and New Zealand [3,4].

Within this context, the control of OsHV-1 infection is considered as a key element to maintain the competitiveness and to increase the sustainability of oyster industry.

However, Pacific oysters as well as all other marine molluscs have unique features in terms of health management [5]. Not only do they live in open marine waters, directly exposed to pathogen infection but they also lack an adaptive immune system. Vaccination is therefore not an option to protect them against virus infection. As a consequence, most strategies currently used for other farmed animal species (e.g., cattle, fish) cannot be directly applied to Pacific oysters. One of the few applicable and promising approaches to limit the harmful effect of pathogens in oyster production is, selective breeding [6].

In animal populations, susceptibility to virus infection and the modulation of disease progression display inter-individual variability [7-9]. The study of host factors that control disease susceptibility relies on the multi-approach analysis of individuals demonstrating a differential response

* Correspondence: Tristan.Renault@ifremer.fr

¹Ifremer (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer), Unité Santé Génétique et Microbiologie des Mollusques (SG2M), Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins (LGPMM), Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France
Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Segarra et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

to OsHV-1 exposure/infection. This type of data will facilitate the identification of new targets with the potential to be integrated in innovative selection strategies. Genes that confer resistance to OsHV-1 may indeed be revealed by combining the "top-down" QTL approach to identify target genomic regions, with "bottom-up" transcript profiling. A QTL analysis for OsHV-1 DNA detection and quantification that was previously performed on five F₂ full-sib families highlighted the relevance of further studying their respective genetic controls [10,11].

Oyster gene expression has already been studied [12-14], particularly since the oyster genome was sequenced [15]. However, most studies relied on the use of oysters collected in the field which are subjected to multiple stressors and pathogens [12,13,16,17]. In addition, only three studies reported OsHV-1 gene expression while the OsHV-1 cycle has never been described at a molecular level [18-20].

The aim of our study was to determine the genetic basis of differential susceptibility to virus infection among Pacific oysters. To overcome the variability of environmental factors, we reproduced the viral infection under controlled laboratory conditions. Sixteen Pacific oyster families were initially challenged with the virulent variant of OsHV-1, μ Var [21]. Survival rates were evaluated five days post-injection and used as a measure of their susceptibility to OsHV-1. In a second step, two Pacific oyster families with contrasted susceptibility were selected for transcript profiling of 39 virus and five oyster immune related genes.

Results

Screening Pacific oyster families for OsHV-1 susceptibility

Two independent experimental infection trials were performed to strengthen the results in terms of survival

rates of the 16 bi-parental families of Pacific oysters that were challenged. After infection, mortality was monitored daily for a period of 120 hours. Control batches systematically displayed 100% survival rates. Results showed that susceptibility to OsHV-1 was different among the tested oyster families (Figure 1). Survival rates were $2 \pm 1.6\%$ for family "A" and $90 \pm 4.5\%$ for family "P" 120 hours post infection (hpi) (Table 1). Based on their survival rates and Wilcoxon test ($p > 0.05$) (Table 1), families A and P were selected to represent the most extreme performances in terms of susceptibility to OsHV-1. A typifies the extremely sensitive family and P the less sensitive family with regard to infection by OsHV-1 (Figure 1).

Comparing two families with contrasted susceptibility to OsHV-1 infection

The respective mean survival rates of families A and P were 37% and 95% at 48 hpi and 0% and 90% at 72 hpi (Kaplan-Meier, Figure 2). At later time points, family A was entirely dead whereas the survival rate was stable (89.5% 72 h and 144 hpi) for family P (Figure 2). As indicated previously, the survival rate was 100% for oyster controls.

Virus DNA was initially detected at 4 hpi for family A and 12 hpi for family P (Figure 3). The mean amounts of viral DNA increased gradually during the course of infection in family A until all oysters died, whereas it increased up to 72 hpi and decreased until 144 hpi in family P (Figure 3). Viral DNA amounts were overall lower in family P than in family A (Figure 3). In family A, individual amounts of OsHV-1 DNA ranged from 0 to 3.2×10^2 , 0 to 1.7×10^1 , 0 to 2.8×10^3 , and 1.2×10^1 to 9.5×10^6 viral DNA copies per ng of total DNA at 4 hpi, 8 hpi, 12 hpi and 26 hpi, respectively. In family P,

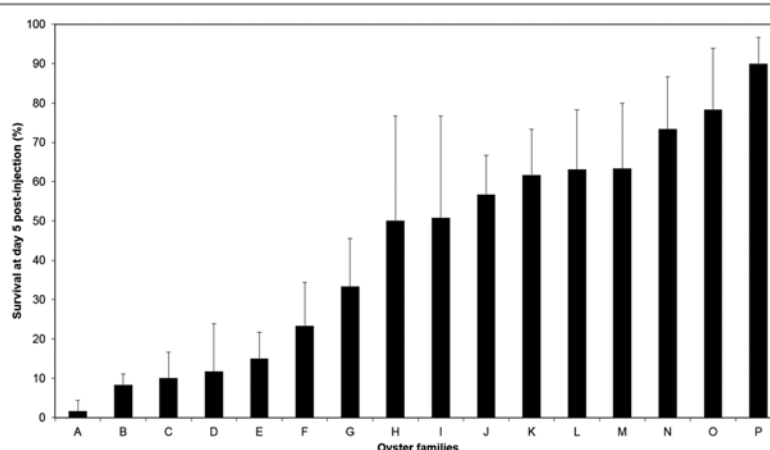


Figure 1 Survival of 16 families of *Crassostrea gigas* oysters at 120 hours post infection during OsHV-1 challenges. Two assays were conducted in triplicates for each family ($n = 60$). For all 16 families, 100% of survival was reported among negative controls injected with 100 μ L of artificial seawater.

Table 1 Survival rates of the challenged families and identification of groups of families with significantly distinct performances

Families	Wilcoxon test (p < 0.05)	Survival post infection (%)					
		0 hpi	24 hpi	48 hpi	72 hpi	96 hpi	120 hpi
A	a	100	100	32 (±9.5)	15 (±5)	3 (±3.3)	2 (±1.6)
B	ab	100	100	53 (±8)	25 (±4.3)	8 (±1.6)	8 (±1.6)
C	bc	100	100	47 (±7.1)	12 (±4)	10 (±3.6)	10 (±3.6)
D	bc	100	100	78 (±9.8)	25 (±7.6)	15 (±6.1)	12 (±6.5)
E	bc	100	100	47 (±5.6)	28 (±6.5)	17 (±3.3)	15 (±3.4)
F	bc	100	100	97 (±5.4)	75 (±11.4)	57 (±11.9)	33 (±6.5)
G	c	100	100	67 (±7.1)	47 (±9.5)	37 (±11.1)	33 (±8)
H	cd	100	100	92 (±5.4)	80 (±7.3)	60 (±12.1)	50 (±13.2)
I	def	100	100	100	90 (±3.3)	80 (±4)	70 (±4.9)
J	de	100	100	88 (±6.3)	66 (±8.5)	62 (±8.9)	60 (±7.9)
K	def	100	100	100	78 (±4.9)	72 (±7)	65 (±6)
L	de	100	100	90 (±6.3)	67 (±10.5)	62 (±10.6)	57 (±8.8)
M	ef	100	100	100	70 (±4.5)	63 (±4.8)	52 (±8.7)
N	ef	100	100	88 (±3)	80 (±5.8)	75 (±7.6)	73 (±6.7)
O	df	100	100	100	90 (±3.6)	73 (±8.7)	73 (±8.7)
P	g	100	100	100	95 (±5)	92 (±4.8)	90 (±4.5)

Groups based on the daily monitoring of mortality during 120 hours post infection (Wilcoxon test). Lowercase letters design a family group significantly different from all the others. All families were tested by pairs and several groups were identified.

individual amounts of OsHV-1 DNA ranged from 0 to 1.4×10^1 , 0 to 1.3×10^5 , 0 to 9.1×10^5 and 0 to 7.2×10^2 viral DNA copies per ng of total DNA at 12 hpi, 26 hpi, 72 hpi and 144 hpi, respectively. No virus DNA was detected in oysters injected with artificial seawater.

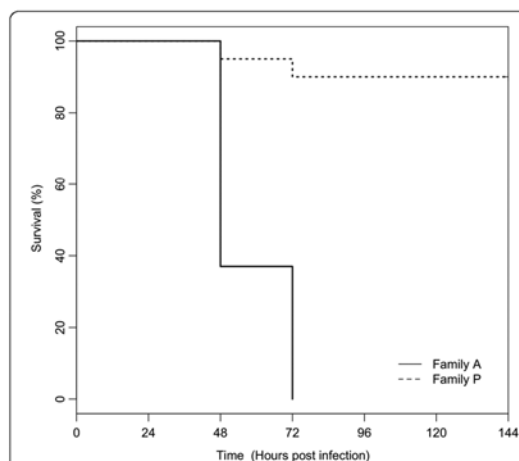
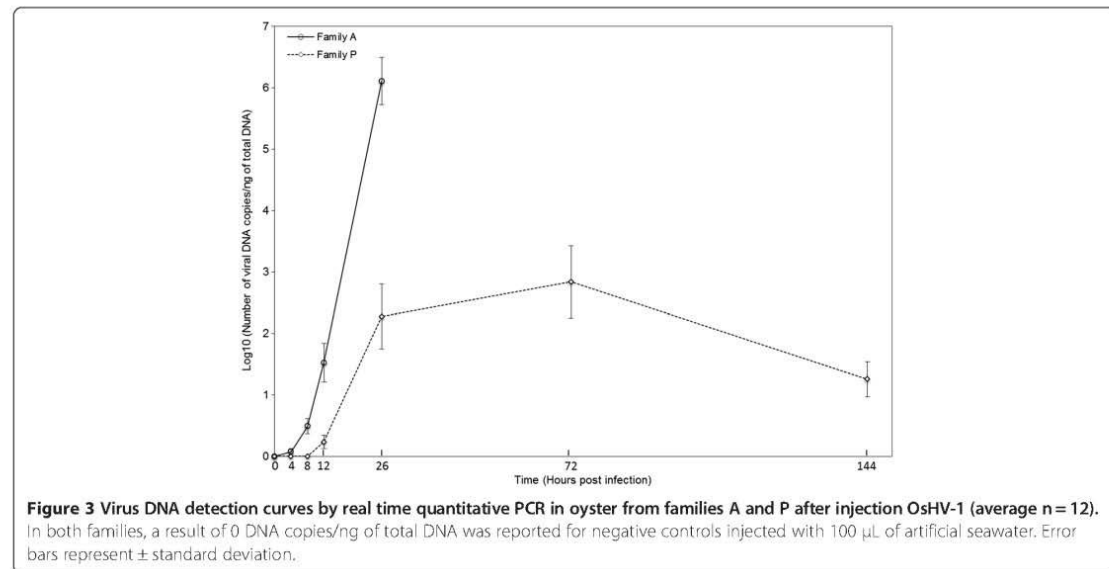


Figure 2 Kaplan-Meier survival curves of two families of *Crassostrea gigas* during infection with OsHV-1. For the third experiment, one tank was used (n = 20). For the two families, 100% of survival was reported among negative controls injected with 100 μ L of artificial seawater.

Detection and expression of OsHV-1 genes in A and P families

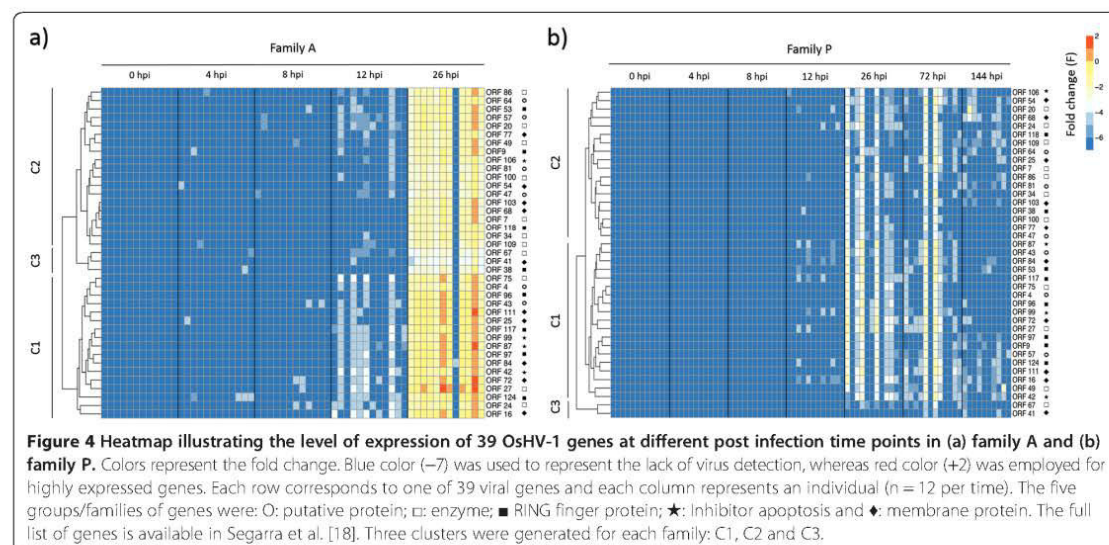
The level of expression in mantle tissue of 39 OsHV-1 genes was studied in both families (A and P) by real-time PCR. These particular genes were selected based on literature data and/or their specific function [1,13]. The full list of OsHV-1 genes is available in Segarra et al. [18]. Normalized expression levels were calculated for each individual at each time point in both families. Two heatmaps were generated (Figure 4a and b). The most striking finding was the existence of different levels of gene expression between both families. All 39 ORFs were significantly over-expressed (Wilcoxon test, $p < 0.05$) in family A in comparison to family P, particularly at 26 hpi ($F = 1.5$ and $F = -1$, respectively). Moreover, initial detection of virus transcripts was performed as early as 4 hpi in family A but did not occur until 12 hpi in family P. In family P, expression levels peaked at 26 and 72 hpi before and decreased at 144 hpi. Differences in terms of expression levels were observed between individuals belonging to the same family and collected at identical time points. No viral transcript was detected at 0 hpi in either family.

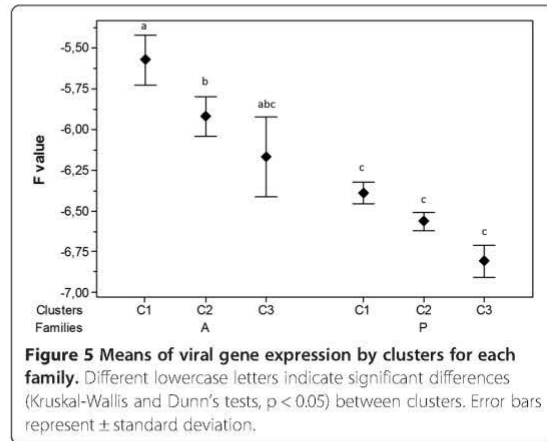
Virus transcripts were grouped by the euclidean method to produce a dendrogram comparing the expression levels of all 39 ORFs (Figure 4a and b). Three clusters were observed for each family. Cluster 1 corresponds to high expression levels, regrouped 17 genes in family A and 19



genes in family P (Figure 4a and b). Cluster 2, with medium expression levels, comprised 19 genes in family A and 18 genes in family P (Figure 4a and b). The third and last cluster included three genes in family A and two genes in family P and was characterized by low expression levels (Figure 4a and b). Significant differences were observed between the three clusters (C1, C2 and C3) in family A whereas no difference was detected in family P for these clusters (Kruskal-Wallis and Dunn's tests, $p < 0.05$)

(Figure 5). However, 82% of the analyzed ORFs (32/39) were classified in the same cluster in both families: 15 genes belonged to cluster 1 (ORF 4, ORF 16, ORF 27, ORF 42, ORF 43, ORF 72, ORF 75, ORF 81, ORF 87, ORF 96, ORF 97, ORF 99, ORF 111, ORF 117, ORF 124); 15 genes to cluster 2 (ORF 7, ORF 20, ORF 34, ORF 47, ORF 54, ORF 64, ORF 68, ORF 77, ORF 81, ORF 86, ORF 100, ORF 103, ORF 106, ORF 109, ORF 118) and two genes to cluster 3 (ORF 41, ORF 67). In both families, three viral





inhibitor of apoptosis (IAP) genes (ORF 42, ORF 87 and ORF 99) out of the four IPAs that were analysed pertained to cluster 1 (Figure 4a and b).

Relative quantification of host gene expression in A and P families

In the third experiment, a significant increase or decrease in mRNA levels was reported for IFI44, MyD88, IAP and Ikb2 at several times post injection in challenged oysters from both families as compared with negative controls (Figures 6 and 7). In family A, IFI44 gene expression was up-regulated at 26 hpi in infected oysters ($R = 24.1$) compared to control oysters ($R = 1.3$) ($p < 0.05$). In family P, IFI44 transcript level (Figure 6) was up-regulated from 26 hpi to 72 hpi and 144 hpi ($R = 10.2$, $R = 33.7$ and $R = 47.3$, respectively) comparatively to the control ($R = 2$, $R = 1.3$ and $R = 1.2$, respectively) ($p < 0.05$). In family A, the expression level of

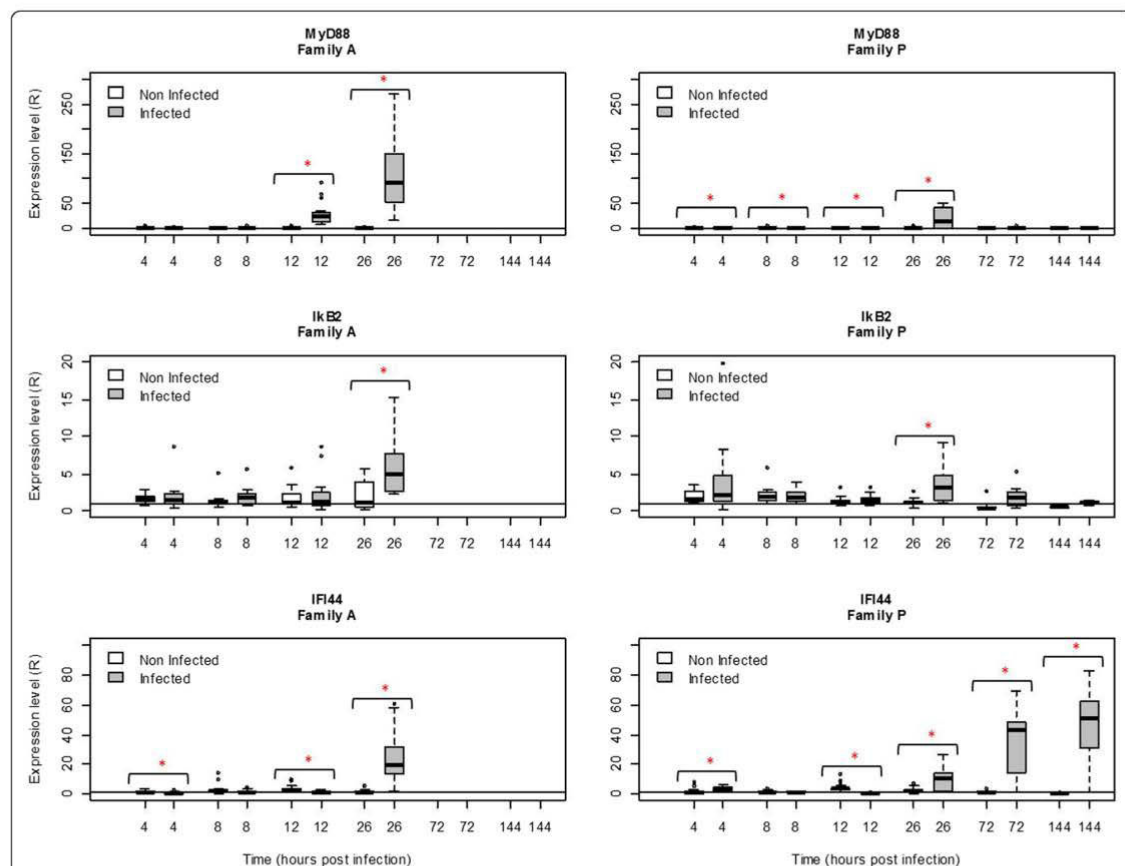
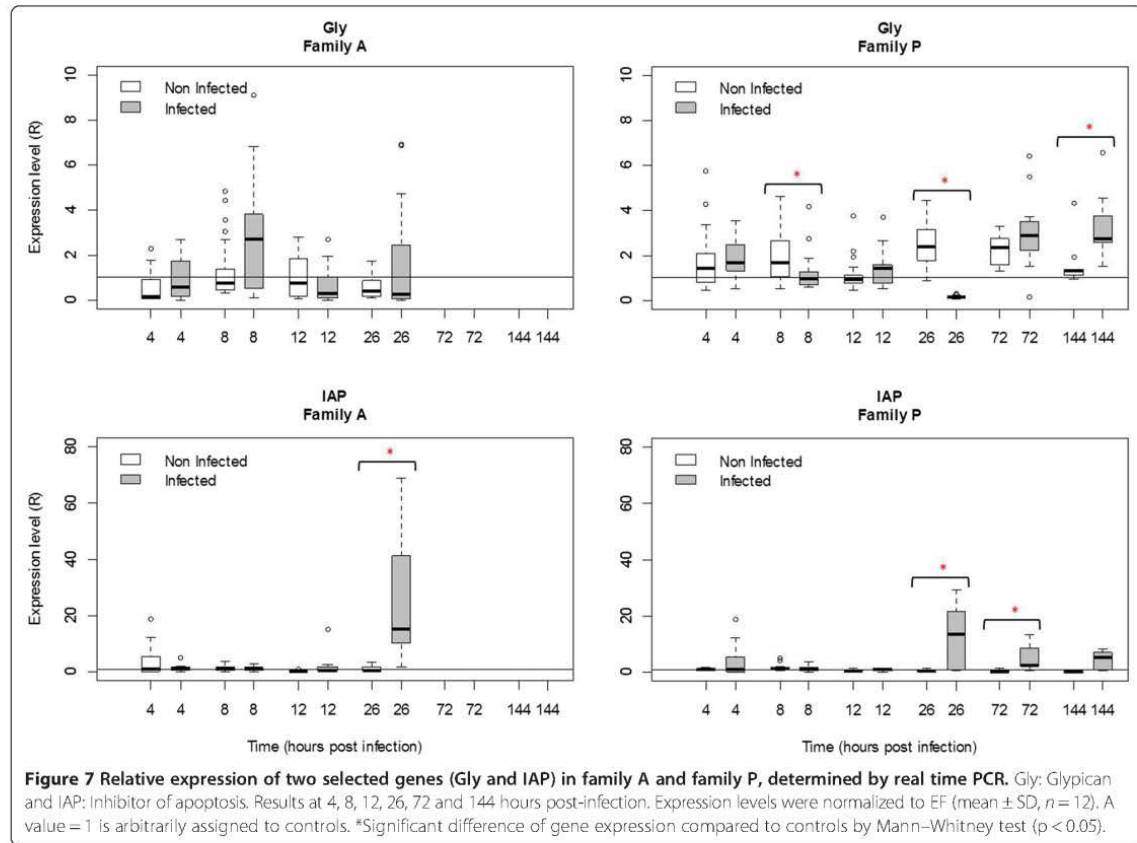


Figure 6 Relative expression of three selected genes (MyD88, Ikb2, and IFI44) in family A and family P, determined by real time PCR. MyD88: myeloid differentiation factor 88, Ikb2: Inhibitor of nuclear factor kappa β kinase beta, and IFI44: Interferon induced protein 44. Results at 4, 8, 12, 26, 72 and 144 hours post-infection. Expression levels were normalized to EF (mean $\pm$ SD, $n = 12$). A value = 1 is arbitrarily assigned to controls. *Significant difference of gene expression compared to controls by Mann-Whitney test ($p < 0.05$).



MyD88 increased significantly ($p < 0.05$) at 12 hpi and 26 hpi in infected oysters ($R = 28.4$ and $R = 122.2$, respectively) comparatively to its level of expression in negative control oysters ($R = 1.2$ at 12 hpi and $R = 0.9$ at 26 hpi) (Figure 6). In family P, MyD88 transcript levels decreased at 12 hpi ($R = 0.2$) and subsequently increased at 26 hpi ($R = 20.4$ fold) as compared with their level in negative control oysters ($p < 0.05$). However, MyD88 transcript levels were similar in infected and negative control oysters at 72 and 144 hpi. For the IAP oyster gene, transcript levels increased significantly ($p < 0.05$) at 26 hpi in infected oysters ($R = 25.5$) versus controls ($R = 2.1$) of family A. In family P, this level was also up-regulated at 26 and 72 hpi in infected oysters ($R = 11.9$ and $R = 5.2$, respectively) versus control oysters ($R = 1.5$ and $R = 1.2$ respectively) ($p < 0.05$) (Figure 7). For IkB2 gene, the number of transcripts increased at 26 hpi in infected oysters in both A and P families ($R = 6.4$ and $R = 3.7$ respectively, $p < 0.05$) (Figure 6).

For the Gly gene, no significant change was observed between infected and control oysters in family A. In family P, the Gly transcript level (Figure 7) was down-regulated at 8 hpi and 26 hpi ($R = 1.7$ and $R = 0.1$ respectively) in

infected oysters compared to controls ($R = 1.2$ and $R = 2.5$ respectively). Then Gly transcript levels were up-regulated at 144 hpi in infected oysters versus controls ($R = 3.2$ versus $R = 1.3$, $p < 0.05$).

Throughout the experiment, the relative expression of these genes did not follow a consistent pattern as they were alternatively up-regulated or down-regulated. This is particularly noticeable in the case of MyD88, IFI44 and Gly.

Using Spearman's test, a rank correlation was determined between the expression of oyster genes and viral DNA amounts. Expression levels of MyD88 ($R_s = 0.7$), IkB2 ($R_s = 0.43$), IFI44 ($R_s = 0.59$) and IAP ($R_s = 0.47$) were positively correlated with viral DNA amount in family A. In family P, a positive correlation was observed only for IFI44 ($R_s = 0.46$) and IAP ($R_s = 0.48$) (Table 2).

In order to compare oyster gene expression levels between families A and P, an Rf ratio was calculated ($R_f = R$ of family A/ R of family P). Our results show differences concerning the expression level of each gene during experimental challenge in controls in families A and P. Nevertheless, at 4 hpi down-regulation of five genes was reported in infected oysters from family A in comparison

Table 2 Viral load and correlation with the levels of expression of four selected in family A and family P (Rs Spearman correlation)

Oyster genes	Family A		Family P	
	Rs	p value	Rs	p value
MyD88	0.70	< 0.000 ⁺	0.73	0.09
Ikb2	0.43	< 0.000 ⁺	0.10	0.46
IF44	0.59	< 0.000 ⁺	0.46	< 0.000 ⁺
Gly	-0.18	0.26	-0.03	0.83
IAP	0.47	< 0.000 ⁺	0.48	< 0.000 ⁺

with family P. At 8 hpi, expression levels were similar in both families. At 12 hpi MyD88 were strongly up-regulated and Gly was down-regulated in infected animals belonging to family A compared to family P. Finally at 26 hpi, MyD88 and Gly were up-regulated in family A as compared with family P (Table 3).

Discussion

The objective of the present study was to compare the susceptibility of Pacific oyster families towards experimental infection by OsHV-1 and to further analyze the basis for contrasted susceptibility in two particular families. In this study, the injection protocol was selected in order to obtain a synchronous infection in all animals at the same time. In our experiments, survival at 120 hours post injection (hpi) was highly variable among the 16 tested families and remained diverse at 144 hpi between families A and P. This result suggests great variability of susceptibility to the viral infection in experimental conditions [22]. Sauvage et al. [10] previously suggested that a significant genetic component exists for susceptibility to the viral infection.

OsHV-1 DNA amounts increased sharply until 26 hpi in family A and to a lesser extent in family P until 72 hpi. The amount of detected OsHV-1 DNA decreased at 144 hpi in family P. The peak of viral DNA copy number preceded the peak of mortality for both families. These results suggest that the virus replicated better in family A, which was affected by the highest mortality rates. In family P, mortality rates remained low but OsHV-1 was

able to replicate. Notwithstanding the development of an active infection some individuals belonging to this family appeared to recover from the infection. Conversely, Verrier et al. [23] showed that resistant cell lines obtained from rhabdovirus-infected fish clones did not support virus production whereas strong virus production took place in a highly susceptible cell line. On the contrary, Purcell et al. [24] reported results that are consistent with those observed in the present study, as resistant rainbow trout families showed lower Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) replication, particularly at very early stages of infection. Others authors investigated the genetic basis underlying contrasted susceptibility to Marek's disease virus (MDV) in chicken through experimental trials [25,26].

Heatmap approach was selected to compare the global viral gene expression profiles for the 39 selected OsHV-1 genes in infected Pacific oysters from families A and P.

Although mortality rates remained very low for family P, virus gene transcripts were detected. Expression levels were clearly different between family A and family P. Cluster studies showed that viral ORFs were over-expressed in family A as compared with family P during the course of time. However, most of the analyzed viral genes (82%) had a similar expression profile in both families. Three different expression profiles were observed in both families: low, moderate and high expression. Among the latter, viral IAP genes (ORF 42, ORF 87 and ORF 99) were identified, suggesting that OsHV-1 may actively manipulate host apoptosis in order to multiply itself. Interestingly, in oysters from the family demonstrating the highest susceptibility to the viral infection (family A) all 39 ORFs were up expressed at 26 hpi in comparison to the less susceptible one (family P). As for virus DNA detection, expression of gene transcripts confirmed that OsHV-1 was able to replicate in oysters from family P to a lesser extent than in oysters from family A. Although virus infection effectively developed in Pacific oysters from family P, most animals appeared to recover from the infection. Moreover, a decrease in the amount of virus transcripts until they became undetectable at 144 hpi was recorded in family P. This result suggests that the virus may enter a persistence/latency phase as described in vertebrate herpesviruses. However, 70% of OsHV-1 genes encode putative proteins with unknown function, which makes the study of virus interactions and of the viral cycle particularly difficult. Other studies would be necessary to further unravel the development of the cycle of OsHV-1, including functional genomics analysis.

Our data also shows high variability of virus gene expression in both oyster families. This could be explained by the involvement of more than one OsHV-1 genotype in the infectious process. However, partial sequencing

Table 3 Transcript ratios for each studied gene in families A and P (Rf = R family A/R family P) at different time points prior to the onset of mortality

Genes	Control				Infected			
	4 h	8 h	12 h	26 h	4 h	8 h	12 h	26 h
MyD88	2.2	0.6	3.6	1.0	0.7	2.0	158.3	6.0
Ikb2	0.9	0.7	1.3	1.8	0.7	1.0	1.5	1.7
IF44	1.0	1.5	0.8	0.8	0.7	1.0	3.7	2.4
Gly	0.3	0.6	1.0	0.2	0.5	2.4	0.5	10.0
IAP	3.7	0.8	0.3	1.8	0.3	0.9	2.7	2.1

and genotyping of six viral microsatellite loci indicated the presence of a unique OsHV-1 genotype (μ Var), in both families after the onset of viral infection (data not shown). The observed variability may therefore be interpreted as the presence in each oyster family of individuals with different degrees of susceptibility to the same OsHV-1 genotype.

These results confirm a genetic basis for susceptibility to OsHV-1 infection in the Pacific oyster [10,11]. Moreover, they suggest that oysters belonging to family P, the less susceptible one, could be able to circumvent infection by OsHV-1 after experimental inoculation of the virus challenge. In this family, a phase of active virus replication took place, as demonstrated by the initial increase of viral DNA and RNA. Ensuing this phase, virus DNA and RNA amounts decreased rapidly suggesting that the host immune defense had been activated and that it might be effective to limit virus multiplication [27,28]. To explore this hypothesis, the expression of immune related genes [20,29] was also monitored by real time PCR.

The expression levels of five host genes (Myeloid differentiation 88 (MyD88), Interferon induced protein 44 (IFI44), Glypican (Gly), Inhibitor of nuclear factor kappaB kinase beta (Ikb2), Inhibitor of Apoptosis (IAP)) were thus analyzed in families A and P. In our study, transcript ratios shown small differences ($R_f > 1$) in control oysters suggesting a family effect on the gene expression. Nevertheless, this ratio was highly different in infected oysters, especially at 12 and 26 hpi for MyD88. It was previously shown that the expression of three of these genes (MyD88, IFI44 and Gly) in *C. gigas* haemocytes is modulated after a contact with OsHV-1 [20]. In the case of Ikb2, decreased abundance of its transcripts was associated with a certain level of resistance to summer mortality [13]. Finally, an inhibitor of apoptosis (IAP) was selected for this study due to the fact that it could play a pivotal role in the Pacific oyster immune defense [30].

MyD88 transcripts were up-regulated at 26 hpi in infected Pacific oysters from both families, although up-regulation was higher in family A ($R_f = 6$). In this family, the expression level of MyD88 was positively correlated with viral DNA amounts in family A ($R_s = 0.70$, $p < 0.00001$) whereas no significant correlation was detected in family P ($p > 0.05$). MyD88 is a universal adapter for the TLR/IL-1R family (TIR). It has been described in many species including humans [31], fish [32], drosophila [33], and molluscs [34]. Several studies demonstrated that MyD88-deficient mice were susceptible to HSV-1 infection [35,36]. The signaling pathway via MyD88 is initiated to activate nuclear factor-kappa B (NF- κ B), c-Jun NH2 terminal kinase (Jnk) and mitogen-activated proteins kinase (MAPKs) [37]. Ikb2 transcripts showed

significant up-regulation only at 26 hpi in both families and expression levels were almost identical in both families ($R_f = 1.7$). Nevertheless, the positive correlation of the expression level of Ikb2 and viral DNA amounts was only observed in family A ($R_s = 0.43$, $p < 0.0001$). Ikb2 is a member of NF- κ B signal pathway and plays an important role in regulating the innate immune response of invertebrates. Zhang et al. [38] described Ikb2 mRNA up-regulation in hemocytes at different time-points (2 and 24 hpi) after contact with *Vibrio alginolyticus* in pearl oyster. Over-expression of both MyD88 and IKB2 genes suggests a crucial role of the NF- κ B signal pathway in virus recognition and cell activation [39]. Some viruses, such as the African swine fever virus (ASFV) [40], HIV [41,42] or EBV [43] have evolved strategies to interfere with NF- κ B activation in order to evade the immune response. However, viruses can also activate NF- κ B to block apoptosis and prolong survival of the host cell in order to gain time for replication and increase the production of viral progeny [44].

Although MyD88 is reported as a key element in the activation of immunity, over-expression of this gene appeared higher in Pacific oysters belonging to family A, which is more susceptible to OsHV-1 infection. In this context, the over expression of MyD88 could be interpreted more as a marker of infectious processes and viral replication than that of an effective antiviral response. Gagnaire et al. [45] previously suggested that gene over-expression in Pacific oysters could lead to tissue injury and thus result in higher mortality rates. Defense mechanisms may play a key role in pathogenesis as they induce cell and tissue damages [46,47].

Here, IFI44 was highly up-regulated in both families and continued to increase in family P at 72 hpi. The detection of increasing levels of IFI44 transcripts in oysters from this family between 72 hpi and 144 hpi was thus concomitant with the detection of decreasing amounts of OsHV-1 DNA and RNA by real-time PCR. Nevertheless, the analysis of data collected throughout the entire experiment reveals an overall positive correlation between the expression of this gene and viral DNA amounts in both families ($R_s = 0.46$, $p < 0.0001$). This result suggests that IFI44 may be a key element for effective antiviral defense against infection by OsHV-1 infection as it provides Pacific oysters with the ability to circumvent the virus proliferation. IFI44 gene is a member of the IFNs (IFN α/β) inducible gene family and may function as a mediator of antiviral activity against hepatitis C or D virus infections through interferons [48,49]. However, the role of IFI44 in antiviral immune response remains unclear.

The glypican transcript level decreased significantly 8 hpi in family P whereas no change was observed in family A as shown by the R_f value. Glypicans belong to a family of heparan sulfate proteoglycans that are linked

to the cell surface by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor [49]. Heparan sulfate proteoglycans may be used by different viruses including herpesviruses as cellular receptors [50]. Binding of a viral protein to heparan sulfate is the first step in a cascade of interactions between viruses and cells that is required for viral entry into the cells and the initiation of infection. CHO cells treated with heparinases that prevent heparan sulfate biosynthesis have reduced capacity to bind HSV-1 and are at least partially resistant to HSV-1 infection [51]. Therefore, our results suggests that reduced glypican levels in family P may obstruct or hinder to some extent OsHV-1 entry in host cells and contribute to this family decreased susceptibility to viral infection.

IAP cellular transcripts were respectively up-regulated in families A and P between 12 hpi and 26 hpi and between 26 hpi and 72 hpi. Our study showed a positive correlation between the level of IAP transcripts and the amounts of viral DNA in both families ($R_s = 0.47$, $p < 0.0001$ for family A and $R_s = 0.48$, $p < 0.0001$ for family P). IAP proteins are conserved throughout animal evolution and can block apoptosis. Apoptosis is one of the major mechanisms of anti-viral response [52]. Over-expression of IAP could be a reaction to the apoptotic process induced by OsHV-1 infection. Nevertheless, some pathogens enter a cell and inhibit apoptosis to increase their life span [53]. All the members of the gamma-herpesvirus family encode genes that are able to inhibit apoptosis including, one or two Bcl-2 homologues [54]. Moreover, studies have shown that HSV-1 require gene Us5 to protect itself from apoptosis induced by certain stimuli [55]. Finally, the contribution of apoptosis to the pathogenesis of West Nile Virus (WNV) encephalitis has been demonstrated by several studies [56,57].

Conclusion

This work is the first step towards elucidating the interactions between OsHV-1 and its host, the Pacific oyster (*C. gigas*). It also represents the first study of viral gene expression in oyster families with contrasted susceptibility to virus infection. In two particular families, contrasted susceptibility was associated with significantly different amounts of virus DNA and RNA, which suggests that susceptibility of Pacific oysters to OsHV-1 may be affected by genetic variations. Previous studies support the hypothesis of a genetic basis underlying resistance to OsHV-1 infection in the Pacific oyster. In addition, the observed differences in terms of susceptibility to infection by OsHV-1 were associated with differences in host gene expression profiles. Finally, the present study is also the first to show positive correlations between viral DNA amounts and the expression of selected oyster genes. These results suggest that the up-regulation of immune related genes may prevent virus

replication and open new questions regarding the persistence and/or latency of the virus within the host. Genes of interest could be further evaluated in oyster breeding programs to determine if they confer genetic resistance to OsHV-1. Such an integrative strategy could be applied to other infectious diseases.

Methods

Animals

Wild oysters *Crassostrea gigas* were randomly sampled from an oyster reef in the Marennes-Oléron Bay in January 2011. The broodstock was acclimated gradually to 21°C over an 8-day period, in one 120 L tank, with a flow of 400 L/h during two months. In order to favor the gametogenesis, a cultured phytoplankton diet was added to the seawater with a continuous flow of 5 L/h (1 million cells/mL) during this period (10% *Isochrysis galbana*, 10% *Chaetoceros pumilum*, 10% *Tetraselmis suecica*, 10% *Pavlova lutheri* and 70% *Skeletonema costatum*). Sixteen biparental families, respectively named A to P were produced in the present study in March 2011 at the Ifremer hatchery in La Tremblade (Charente Maritime, France) during the course of the Bivalife EU funded project (FP7, 2011–2014). For each parent, spermatozooids or oocytes were individually collected by stripping the gonad of males and females respectively, and each crossing was performed following a previously reported protocol [58], and reared as described in Ernande et al. [22].

No specific permits are required at national and European levels for the described experimental study. The Pacific oyster *C. gigas* is not an endangered or a protected species.

Defining OsHV-1 susceptibility of 16 Pacific oyster families

Experimental infections were carried out using the 16 produced families (9 months old, 3 cm). Thirty spat of each family were "anaesthetized" during 4 h in a solution containing magnesium chloride ($MgCl_2$, 50 g/L) in a mixture of seawater (1 v)/ distilled water (4 v) [59]. One hundred μ L of an OsHV-1 (μ Var, [21]) suspension adjusted at 10^3 copies of viral DNA/ μ L were injected into the adductor muscle of each individual using a 1 mL syringe [59]. Pacific oysters were then placed in 3 tanks (10 oysters per tank) containing 5 L of filtered seawater (1 μ m) at 22°C. Similarly, 30 spat from each family were injected with 100 μ L of artificial seawater as a control. Mortality was checked every day. Two similar assays were conducted in October 2011.

Experimental infection of two oyster families presenting contrasted OsHV-1 susceptibility

A third trial was carried out. One hundred and sixty oysters (10 month old, 3 cm) from families A and P were "anesthetized" during 4 h as previously described. One

hundred μL of artificial seawater or a viral suspension at 10^3 copies of viral DNA/ μL (μVar) were injected into the adductor muscle of 80 oysters for each family as already reported [59]. Oysters were then distributed in 4 tanks per condition (seawater vs viral suspension) and per family (20 animals per tank). One tank per condition was dedicated to record survival and the three others were dedicated for the sampling.

Four live oysters per tank, condition and family were collected 0, 4, 8, 12 and 26 hours post-injection (hpi) for both families, as well as 72 hpi and 144 hpi for family P. Two pieces of mantle were sampled from each individual. The first piece (50 to 100 mg) was disposed in a tube containing 1 mL of TRIzol[®] Reagent[™] (Ambion[®]) and frozen at -80°C for RNA extraction. The second piece was directly frozen at -20°C in a tube for DNA extraction.

Total DNA or RNA extraction and cDNA synthesis

DNA extraction was performed with QiAamp tissue mini kit[®] (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol. Elution was performed in 100 μL of AE buffer provided in the kit.

Total RNA was extracted using TRIzol[®] Reagent[™] (Ambion[®]) according to the manufacturer's recommendations. Total RNA was treated with Turbo[™] DNase (Ambion[®]) to remove genomic DNA. The RNA quality and quantity were determined using NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) and Bioanalyser 2100 (Agilent). First-strand cDNA synthesis was carried out using the Super-Script[®] III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) using 8000 ng of RNA treated. A No RT was performed after each DNase treatment using real time PCR in order to control absence of oyster and/or virus genomic DNA

using EF primers (Table 4) and C9/C10 primers [60] respectively.

OsHV-1 DNA quantification and gene expression by real-time PCR

OsHV-1 DNA quantification

OsHV-1 DNA quantification was carried out in the third trial using a real-time PCR protocol [61]. Real-time PCR was performed in duplicate using a Mx3000 Thermocycler sequence detector (Agilent). Amplification reactions were performed in a total volume of 20 μL . Each well contained 5 μL of genomic DNA (5 ng/ μL), 10 μL of Brilliant III Ultra-Fast SYBR[®] Green Master Mix (Agilent), 2 μL of each primer (3 μM) and 1 μL of distilled water. Real time PCR cycling conditions were as follow: 3 min at 95°C , followed by 40 cycles of amplification at 95°C for 5 s, 60°C for 20 s. Melting curves were also plotted (55 - 95°C) in order to ensure that a single PCR product was amplified for each set of primers. Negative controls (without DNA) were included.

Viral gene expression

Real-time quantitative RT PCR was used to study the expression of 39 viral genes using the previously described protocol with 5 μL of cDNA dilution (1/30) instead of genomic DNA [18]. Normalized relative viral gene expression levels were calculated for each individual with formula: $F = \log_{10}[(E + 1)^{40 - Ct}/N]$ adapted from De Decker et al. [62], where E is efficiency of each ORFs [18], Ct (threshold cycle) corresponds to the PCR cycle number, N is the maximal number (10^7) of viral DNA copies/ng of total DNA detected minus number of viral DNA copies/ng of total DNA determinate by absolute real time PCR for each individual and $Ct = 40$ is arbitrarily considered to correspond to 'no Ct' obtained by real time PCR.

Table 4 List of oyster genes targeted by real time PCR

GenBank	EST name	Abbreviation	Forward primer Reverse primer	Efficiency (%)	Primer reference
DQ530619	Myeloid differentiation factor 88	MyD88	CGTGGCA1GGACGGATAACAACG GGCCCGAGCAGTACCTCTGTGGAATC	97.5	[20]
AM856743	NF-Kappa-B-inhibitor ectasis	Ik32	CAGCATTCACTGACGACGAT TCTGCTCAGTTTGTCTGTG	104	[24]
FJ440108	Interferon Induced Protein 44	IF44	1GG1GGAC1A1GGACCGGACAG1G GGTAGACAGTGGTGAGGCTGTGCT	93.8	
EU678311	Gypican	Gy	AAC1ACTGCTCAACACCATGAA 1AGG1G1CACCAACAGAACAC	102.1	
JF818926	Baculoviral AP repeat-containing protein 2	IA2	CCCGAAAACG1AACC1CAGA 111CG111G1G1C1A111G	103	Barbosa-Solomieu et al., 2013
A3122066	Elongation Factor	EF	AGTCAACCAAGGCTGCACAGAAAG TCCGACGTATTTCTTTGCGATGT	98.8	

Host gene expression

Moreover, the relative expression of five genes from *Crassostrea gigas* spat were studied during the third OsHV-1 experimental infection at 4, 8, 12, 26 hpi for both families and 72 and 144 hpi for family P. The relative quantification value (ratio R) was calculated using the method described by Pfaffl [63]: $R = \frac{[E_{\text{target}}]^{\Delta CT_{\text{target}}(\text{control sample})}}{[(E_{\text{EFa-1}})]^{\Delta CT_{\text{EFa-1}}(\text{control sample})}}$. The efficiency of each primer pair was determined by constructing a standard curve from serial dilutions (Table 4). These 5 genes from Pacific oyster were (i) myeloid differentiation factor 88 (MyD88), (ii) NF kappa-B inhibitor cactus (Ikb2), (iii) interferon-induced protein 44 (IFI44), (iv) glypican (Gly), (v) Baculoviral apoptosis inhibitor repeat-containing protein 2 (IAP) genes (Table 4). Host gene expression was normalized to the elongation factor 1 (EF), as no significant differences of Ct values were observed for this house-keeping gene between several conditions during the course time (CV = 3.2%, Kruskal-Wallis test Z = 0.19, p > 0.05). Nevertheless, the variance analysis of EF Ct value demonstrated a significant difference were between families (Kruskal-Wallis test, Z = 2.19, p < 0.05). The calibrator used for the experiment consisted of individuals sampled at time 0 hpi from each family.

Data analysis

Kaplan-Meier survival curves and the Wilcoxon test were used to characterize and compare survival between oyster families.

Cts were calculated with the Stratagene Mxpro software 4.0. A heatmap was generated in order to represent the viral gene expression using the 'pheatmap' package in R. Clustering of viral genes was performed using the euclidean method. Results for relative expression of oyster genes were expressed as boxplot. Kruskal-Wallis and Dunn's tests were used to analyze viral clusters, and a Mann-Whitney test was used to analyze oyster gene expression.

Correlations between viral load and oyster gene expression were tested with the Spearman's nonparametric rho (Rs). All statistical computations were performed with the XLSTAT software (version 2013), and results were declared statistically significant at the two-sided 5% (i.e., P < 0.05). The Rf ratio was calculated using the expression level (R) in family A/ the expression level (R) in family P in order to compare the oyster gene expression between both families.

Competing interests

This work was supported by Ifremer (Institut Français pour l'Exploitation de la Mer). The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

This study is the result of a collective work. AS, MA and ER conceived this study, and participated in its design. All others carried out experimental assays. AS and ER drafted the manuscript. All authors read, corrected, and approved the final manuscript.

Acknowledgement

The authors wish to thank the Ifremer hatchery team (COPAM) in La Tremblade and the nursery team (USPC) in Boulogne for the production of Pacific oysters. This work was supported by the EU-funded project Bivalve (FP7, n° 266153), the project MOLTURA (FP7-NET EVMDA) and the Region Poitou-Charentes. Thanks to G. Tilière for virus genotyping and B. Morge for his comments and suggestions on the manuscript.

Author details

¹Ifremer (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer), Unité Santé Génétique et Microbiologie des Mollusques (SG2M), Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins (LGM3M), Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France. ²Ifremer, Laboratoire Environnement Ressources des Petites Charentes (LERPC), Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France.

Received: 4 March 2014 Accepted: 1 July 2014

Published: 9 July 2014

References

- Dawson AJ, Trus PL, Cheng N, Steven AG, Watson MS, Cunningham CJ, Le Deuff EM, Renaud F: A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J Gen Virol* 2002, **83**(Pt 1):41-53.
- Dawson AJ, Eberle B, Hilbers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Fellous EE, Bolmsten B, Snodder M, Thiry F: The order Herpesvirales. *Arch Virol* 2009, **154**(3):1-177.
- Renaud F, Moreau F, Laury H, Pepin JH, Segarra A, Michel S: Analysis of clinical Ostreid herpesvirus 1 (*Malacoherpesviridae*) specimens by sequencing amplified fragments from three virus genome areas. *J Virol* 2012, **86**(5):162-164.
- Jenkins C, Hick P, Gabor M, Spiers Z, Hill SA, Gu X, Head A, Gao J, Dove M, O'Connor M, Kirkland PD, Francis J: Identification and characterisation of an ostreid herpesvirus-1 microvariant (OsHV-1 μ-var) in *Crassostrea gigas* (Pacific oysters) in Australia. *Dis Aquat Organ* 2013, **105**:193-200.
- Renaud F: Pacific Cupped Oyster, *Crassostrea gigas*, Mortality Outbreaks and Infectious Diseases. In *Oysters: Physical and Genetic Aspects*. Edited by Qin ZG. New York: Nova Science Publishers Inc; 2012:209-225 [Chapter 8].
- Dégremont L, Bédier E, Boudry P: Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). II. Response to selection for survival and its influence on growth and yield. *Aquaculture* 2010, **299**:21-29.
- Kiryluk K, Martinez J, Ghareeb AG: Genetic susceptibility, HIV infection, and the kidney. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007, **2**(Supplement 1):S75-S78.
- Morales M, Chénou F, Gauthier N, de Pablo F, Portillo F, Cañizares M, Vaqueiro M, Roussin G, Millán L, López Botet M, Viches C: Host genetic factors in susceptibility to herpes simplex type 1 virus infection: contribution of polymorphic genes at the interface of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 2012, **188**:1112-1120.
- Schmidt F, Sennari A, Vargnes A, Degremont L, de Lencastre J: Sequence polymorphism and expression variability of *Crassostrea gigas* immune related genes discriminate two oyster lines contrasted in term of resistance to summer mortalities. *PLoS One* 2013, **8**(7):5800.
- Sauvage C, Papi J, Lapègue S, Boudry P, Renaud F: Ostreid herpes virus 1 infection in families of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during a summer mortality outbreak: Differences in viral DNA detection and quantification using real-time PCR. *Virus Res* 2009, **142**:161-167.
- Sauvage C, Boudry P, de Koning D, Bailey CS, Heuthebach S, Lapègue S: QTL for resistance to summer mortality and OsHV-1 load in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Arch Genet* 2010, **41**:390-399.
- Bouaux A, Leloup M, Eliaoui J, Foussin M, Mathieu M, Telong G: Physiological change under OsHV-1 contamination in Pacific oyster *Crassostrea gigas* through massive mortality events on fields. *BMC Genomics* 2013, **14**:550.
- Flouy E, Huet A: Microarray analysis highlights immune response of Pacific oysters as a determinant of resistance to summer mortality. *Mol Biotechnol* 2012, **14**:203-217.
- Normand E, Li R, Quillen V, Nicolas JJ, Bouary E, Penier E, Huet A: Contrasted survival under field or controlled conditions displays associations between mRNA levels of candidate genes and response to OsHV-1 infection in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Genomics* 2014, **12**:95-103.

15. Zheng G, Tang X, Guo X, Li L, Luo R, Xu F, Tang P, Zheng L, Wang X, Qiu L, Xiang Z, Qie L, Xie Y, Holland PMH, Baps J, Zhu Y, Wu F, Chen Y, Wang J, Feng Q, Meng J, Yang J, Liu J, Wei B, Zheng H, Huang Z, Zhu Q, Tang Y, Mouni A, Hedgecock D, et al: The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 2012, **490**:49–54.
16. Henry B, Meil J, Boulo V, Daniel JM, Maurin D, Hénaut A, Carpentier C, Boudry P, Faveil P, Laves A: Microarray-based identification of gonad transcripts differentially expressed between lines of Pacific oyster selected to be resistant or susceptible to summer mortality. *Mar Biotechnol* 2009, **12**:326–339.
17. Dineley NJ, Lefang C, Faveil P, Faveil P: Development of a Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) 31,918-feature microarray: identification of reference genes and tissue-enriched expression patterns. *BMC Genomics* 2011, **12**:468.
18. Segarra A, Henry N, Pèpin J-H, Renaud J: Transcriptomic study of 39 ostreid herpesvirus 1 genes during an experimental infection. *J Invertebr Pathol* 2014, **119**:CS–T.
19. Buge CA, Fishman CE: Quantifying Ostreid herpesvirus (OsHV-1) genome copies and expression during transmission. *Microb Ecol* 2012, **63**:596–604.
20. Renaud J, Henry N, Barbosa-Solomieu V, Moreau K: Suppression subtractive hybridisation (SSH) and real time PCR reveal differential gene expression in the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, challenged with Ostreid herpesvirus 1. *Dis. Aquat. Organism* 2011, **35**:725–735.
21. Segarra A, Pèpin J-H, Azou L, Morga B, Henry N, Renaud J: Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res* 2010, **153**:92–99.
22. Ernande B, Clober J, McLambie E, Boudry P: Genetic polymorphism and trade-offs in the early life-history strategy of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795): a quantitative genetic study. *J Evol Biol* 2013, **16**:394–414.
23. Verrier ER, Langwin C, Tohy C, Houli A, Ducrocq V, Benmansour A, Quillet F, Bouchon P: Genetic resistance to Rhabdovirus infection in teleost fish is paralleled to the derived cell resistance status. *PLoS One* 2012, **7**:e33935.
24. Porcell MK, Iwama SE, Woodson JC, Rurch G, Weston JB: Early viral replication and induced or constitutive immunity in rainbow trout families with differential resistance to Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Fish Shellfish Immunol* 2010, **28**:94–105.
25. Wang Y, Qiu M, Yang J, Zhao X, Wang Y, Zhu Q, Liu Y: Sequence variations of the MHC class I gene exon 2 and exon 3 between infected and uninfected chickens challenged with Marek's disease virus. *Infect. Genet. Evol.* 2014, **21**:103–109.
26. Bittert HM, Fulton JE, O'N, Egan NP, Arthur JA, Cheng H, Wang J, Soller M, Dekkers JC: Mapping QTL affecting resistance to Marek's disease in an F6 advanced intercross population of commercial layer chickens. *BMC Genomics* 2009, **10**:70.
27. Klimpel GR: Immune Defenses. In *Avian Microbiol* 4th edition. Edited by Baron S, Gyles C. (Tav): University of Texas Medical Branch & Galveston; 1996.
28. Levy ME: The importance of the innate immune system in controlling HIV infection and disease. *Trends Microbiol* 2003, **22**:3–16.
29. Green L, Magnani C: Poly I:C against subsequent challenge with Ostreid herpesvirus (OsHV-1) (var). *Fish Shellfish Immunol* 2013, **35**:360–368.
30. Doyeux CL, Boed JC: IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 2005, **19**:270–282.
31. Hultmark B: Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **199**: 44–46.
32. Takane I, Kondo T, Hirano T, Sato T, Endo M, Aoki T: Identification and characterization of a myeloid differentiation factor 88 (MyD88) cDNA and gene in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Dev. Comp. Immunol.* 2006, **30**:867–876.
33. Hama T, Medzhitov R: Drosophila MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000, **98**:7664–7669.
34. Qiu L, Song L, Yu Y, Xu W, Ni D, Zhang Q: Identification and characterization of a myeloid differentiation factor 88 (MyD88) cDNA from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immunol* 2009, **23**:614–623.
35. Menon DS, Krohn FG, Neppiah M, Aronow BJ, Bocharov SCC, Akent S, Garzelli RT, Campa MA: Lethal encephalitis in myeloid differentiation factor 88-deficient mice infected with herpes simplex virus 1. *Am. J. Pathol.* 2005, **166**:14–24.
36. Ma C, He B: Recognition of herpes simplex viruses: toll-like receptors and beyond. *J. Mol. Biol.* 2010, **426**:1132–1147.
37. Janssens S, Doyeux R: A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends Microbiol.* 2002, **27**:44–49.
38. Zhang L, Jiang S, Qiu L, Xu L, Wu B, Li Y, Zhu C, Yu X: Molecular characterization and expression analysis of the IκB gene from pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Shellfish Immunol* 2009, **26**:84–90.
39. Senetere MG, Posselt A, Amici C: NF-κB and virus infection: who controls whom. *IMBIO J* 2003, **22**:2552–2560.
40. Revilla T: Inhibition of nuclear factor kappa B activation by a virus-encoded Iκappa B-like protein. *J Biol Chem* 1998, **273**:5405–5411.
41. Akira H: The human immunodeficiency virus type 1 accessory protein Vpu induces apoptosis by suppressing the nuclear factor kappaB-dependent expression of antiapoptotic factors. *J Exp Med* 2003, **194**:794–812.
42. Roul S: The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein inhibits NF-kappa B activation by interfering with beta TrCP-mediated degradation of Iκappa B. *J Biol Chem* 2000, **275**:15520–15528.
43. Diestel PJ, Nagasawa M, Prater JC, Kellner CA, Gellera FV: Inactivation of NF-kappaB by EBV BZLF1-encoded ZEBRA protein in human T cells. *Immunity* 1999, **10**:621–628.
44. Foulston A, Marcellus RC, Bianchi FE: Viruses and Apoptosis. *Annu Rev Microbiol* 1996, **53**:577–608.
45. Cognate R, Gay M, Laves A, Daniel JM, Saulnier O, Renaud J: Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: In vivo effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic Toxicol* 2007, **84**:57–67.
46. Fessler C, Swill JS, Moagher L: The neutrophil. *Can Opin Immunol* 1980, **2**: 6–8.
47. Sherwood ER, Toller-Kinsky T: Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2004, **18**:385–405.
48. Balan M, Nelson DB, Sulkowski MS, Everson GT, Lantier LR, Wiesner EH, Dickson BL, Garcia A, Meier PA, Yu E, Subramanian GM: Modulation of interferon-specific gene expression by albumin-interferon-alpha in interferon alpha experienced patients with chronic hepatitis C. *Antivir Ther* 2006, **11**:901–908.
49. Filmus J: Glycans in growth control and cancer. *Glycobiology* 2000, **10**: 315–338.
50. Spear PG: Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol* 2004, **6**:401–410.
51. Shieh MT, Yu-Denn D, Montgomerie RL, Eske JE, Spear PG: Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biol* 1992, **116**:1273–1281.
52. Barber: Host defense, viruses and apoptosis. 2001. 8. Publ Online 22 Feb 2001. doi:10.1038/4400033.
53. Gifford S, Ruby J: Evasion of apoptosis by DNA viruses. *Immunity Cell Biol* 1996, **74**:537–537.
54. Lagunoff M, Candel PA: Inhibition of apoptosis by the gamma-herpesviruses. *Int Rev Immunol* 2004, **22**:573–590.
55. Kottmann RB, Fox PJ, Uhm C, Seem A, Lee H, Corey L: Herpes simplex virus inhibits apoptosis through the action of two genes, Us5 and Us3. *J Virol* 1999, **73**:8490–8497.
56. Chu JH, Ng MC: The mechanism of cell death during West Nile virus infection is dependent on initial infectious dose. *J Gen Virol* 2003, **84**:3205–3214.
57. Kleinschmidt MC, Michaelis M, Ogborn E, Doer HW, Cnied J: Inhibition of apoptosis prevents West Nile virus induced cell death. *BMC Microbiol* 2017, **7**:9.
58. Dégremont L, Bédier E, Solodchik P, Robert M, Huvert A, Meil J, Samson J-F, Boudry P: Relative importance of family, site, and field placement timing on survival, growth, and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 2005, **249**:13–29.
59. Schikowski D, Renaud J, Saulnier O, Henry N, Moreau K, Pèpin J-H: Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. *Vir Res* 2011, **42**:27.
60. Barbosa-Solomieu V, Mabisson L, Morquec-Auarez B, Ascencio Valle L, Renaud J: Diagnosis of ostreid herpesvirus 1 in fixed paraffin-embedded archival samples using PCR and in situ hybridization. *J Biol Microbiol* 2004, **119**:705–710.

61. Pepin JF, Riou A, Renault T: Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *J Virol Methods* 2008, **149**:269–276.
62. De Decker S, Reynaud Y, Saulnier D: First molecular evidence of cross-species induction of metalloprotease gene expression in *Vibrio* strains pathogenic for Pacific oyster *Crassostrea gigas* involving a quorum sensing system. *Aquaculture* 2013, **392**–395:1–7.
63. Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001, **29**:e45.

doi:10.1186/1471-2164-15-580

Cite this article as: Segarra et al.: Dual transcriptomics of virus-host interactions: comparing two Pacific oyster families presenting contrasted susceptibility to ostreid herpesvirus 1. *BMC Genomics* 2014 **15**:580.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



II. Est-il possible de détecter une excrétion différentielle d'ADN viral lors d'une infection expérimentale chez des aniamux appartenant à deux familles d'huîtres creuses (résultats complémentaires)?

Nous avons pu montrer qu'il existait des différences de niveaux d'expression des gènes viraux suivant le fond génétique de la famille étudiée (**article 3**, p131). Au vu de l'ensemble de ces résultats, nous avons souhaité étudier s'il existait des différences en matière d'excrétion virale pour des animaux présentant des niveaux contrastés de sensibilité à la maladie. En effet, des huîtres infectées ne présentant pas de mortalité pourraient jouer le rôle de vecteur et de réservoir du virus, permettant ainsi la transmission de ce dernier à des individus sains. Sauvage et coll. (2009) ont montré par PCR en temps réel, la présence d'ADN OsHV-1 (de l'ordre de 10^2 copies/L) dans l'eau de mer lors d'épisodes de mortalité massive d'huîtres creuses.

Ainsi, l'objectif de ce travail était de déterminer les quantités de virus excrétées (au travers de la quantification de l'ADN viral) après infection expérimentale par injection chez des individus appartenant aux familles A et P (**article 3**, p131). Des animaux, âgés de sept mois, issus d'une seconde génération (G2) ont été utilisés. Le protocole d'infection a été le même que celui décrit dans l'**article 3** (p131). Ainsi, 100 μ L d'une suspension virale contenant 10^3 copies d'ADN viral/ μ L ou d'eau de mer (contrôle), ont été injectés dans le muscle adducteur de chaque huître (n=10 individus par famille). Chaque huître a été placée individuellement dans un b cher avec bulleur contenant 500 mL d'eau de mer trait e aux UV. La quantité d'ADN viral dans l'eau a été recherch e par PCR en temps réel à différents temps (4, 8, 12, 26, 32, 48, 58, 72, 96, 120 hpi pour aniamux appartenant aux deux familles et 144 hpi pour la famille P). Les huîtres mortes ont été laiss es dans le b cher jusqu'à la fin de l'expérience.

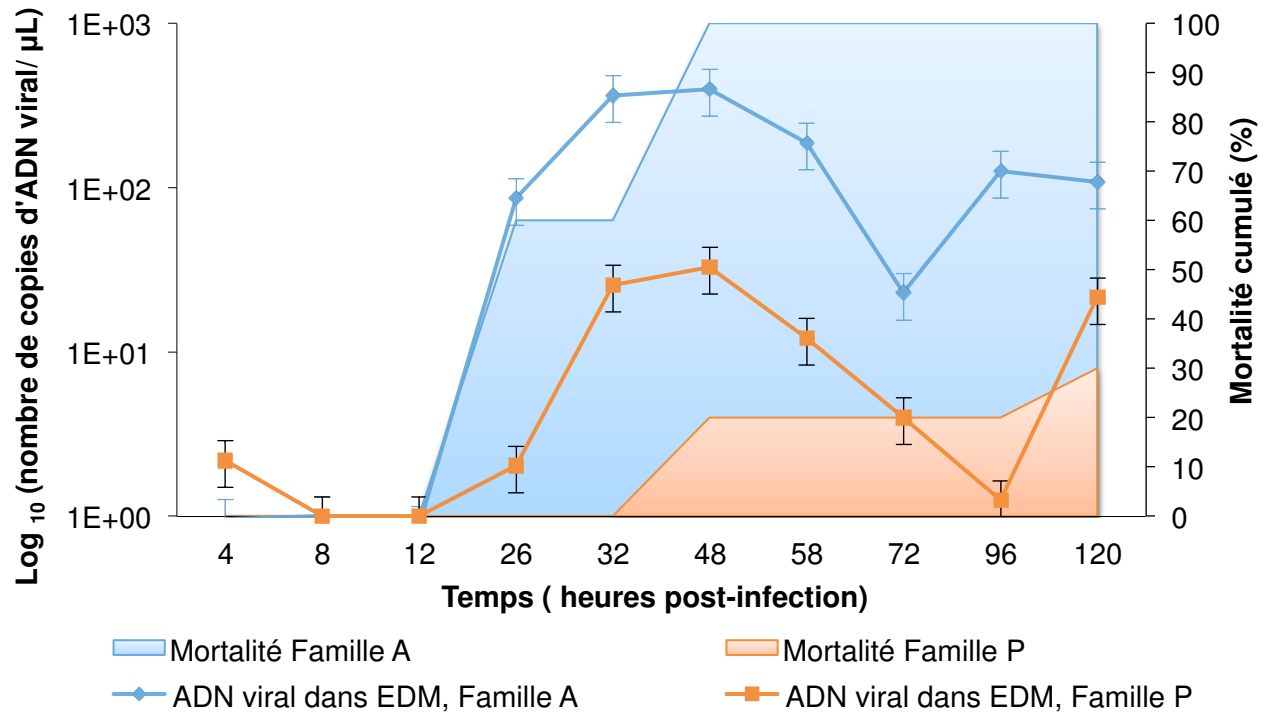


Figure 19: Mortalité cumulée et quantité d'ADN viral détectée dans l'eau de mer pour les familles A et P. Les aires représentent la mortalité cumulée en pourcentage pour les familles A (bleue) et P (orange). Les courbes représentent la quantité d'ADN viral détectée dans l'eau de mer pour la famille A (bleue) et la famille P (orange). N=10/temps et famille. Les barres d'erreurs représentent l'écart type standard.

Dans un premier temps, le suivi de mortalité a confirmé une différence significative (test de Kruskal-Wallis, $p < 0.05$) de sensibilité à l'infection entre les individus des deux familles A et P (**Figure 19**, p145). La famille A a présenté un taux de mortalité de 100 % à 48 hpi alors que celui de la famille P n'a pas dépassé 30% 120 hpi. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour la première génération (Segarra *et al.*, 2014, **article 3**).

La quantité d'ADN viral présente dans l'eau de mer est corrélée positivement avec les mortalités observées pour chacune des familles (test de Spearman $R_s = 0.6$ et $R_s = 0.7$, pour les familles A et P respectivement, $p < 0.05$). Les résultats ont révélé une quantité d'ADN viral significativement supérieure ($\times 10$) dans l'eau de mer pour les individus de la famille A que dans celle contenant les individus de la famille P (test de Kruskal-Wallis, $Z = 7.54$, $p < 0.05$) (**Figure 19**, p145). Cette différence suggère que les animaux appartenant à la famille la moins sensible, la famille P, excrèteraient moins de virus que ceux de la famille la plus sensible. Ainsi, le fond génétique pourrait avoir un impact quant à la transmission du virus.

L'utilisation d'un plus grand nombre de familles contrastées est nécessaire pour confirmer cette hypothèse. En effet, dans le cas présent, seules deux familles ont été suivies. Il est donc difficile d'écarter le biais d'un éventuel effet famille. Néanmoins, (Dégremont *et al.*, 2013) ont montré que la transmission horizontale de l'infection par OsHV-1 entre les huîtres peut être liée à leur fond génétique. Les résultats obtenus soulignent également que des individus infectés, mais ne présentant aucune mortalité, peuvent être excréteurs de virus. Ces animaux peuvent être considérés soit comme des porteurs asymptomatiques soit comme des individus malades sans qu'il soit possible d'observer des symptômes particuliers du fait de la présence de la coquille et du manque de marqueurs de santé chez les mollusques marins.

Dans cette étude, la détection d'ADN viral dans l'eau est synchrone avec l'observation des premières mortalités pour la famille A. En revanche, celle-ci est précédée des premières mortalités pour les animaux de la famille P (**Figure 19**, p145). Néanmoins, des similitudes apparaissent entre les cinétiques de détection d'ADN viral pour les individus des deux familles. Pour les deux groupes, l'ADN viral a été détecté dans l'eau à partir de 26 hpi suivi d'un pic compris entre 32 et 48 hpi. Une diminution des quantités d'ADN détectées est ensuite visible entre 48 et 72 hpi pour les individus de la famille A et entre 48 et 96 hpi pour les individus de la famille P. La durée d'excrétion du virus est relativement comparable entre les deux familles (46 h). Après cette période, un nouveau pic de détection de l'ADN viral est observé dans l'eau de mer pour les individus des deux familles. L'interprétation du second pic de détection à 72 hpi chez la famille A reste complexe dans la mesure où tous les individus sont morts à 48 hpi. L'hypothèse la plus probable est la décomposition des huîtres induisant une libération importante d'ADN et/ou de particules virales présentes dans les tissus. En effet, les animaux morts ont été laissés dans les béciers durant la durée des expériences. Chez la famille P, ce second pic de détection, est très certainement dû à la mort d'un individu à 48 hpi.

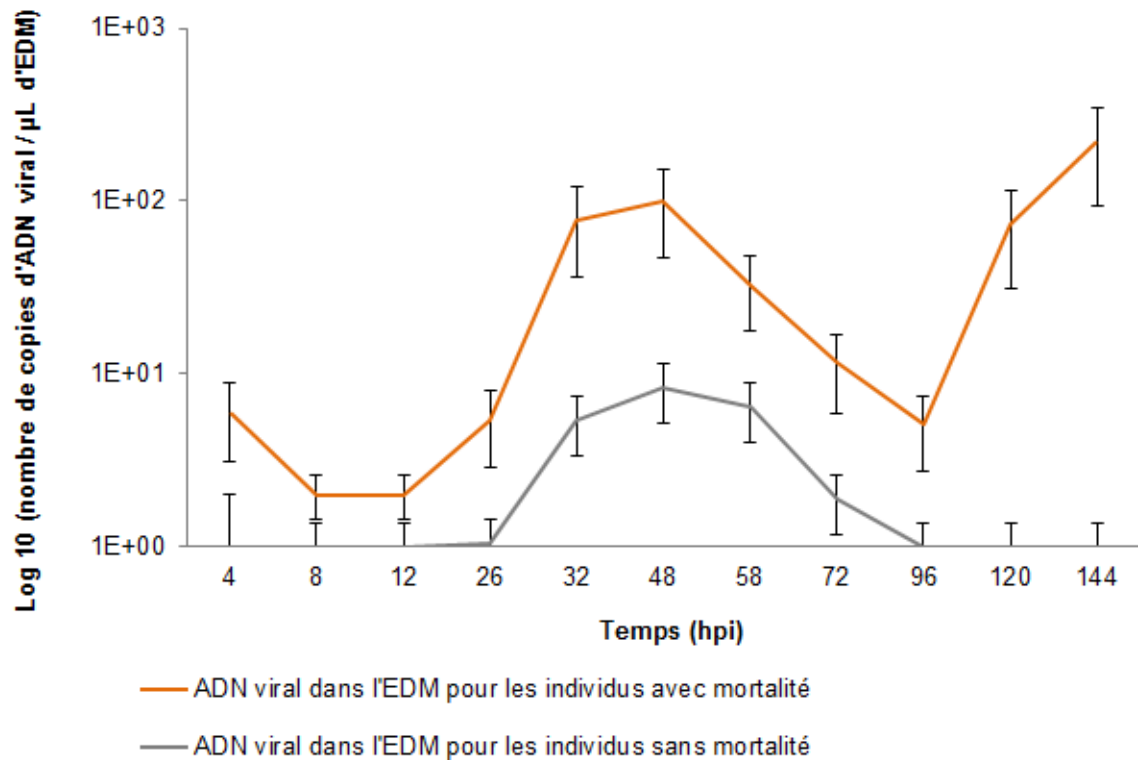


Figure 20: Quantité d'ADN viral détectée dans l'eau de mer pour la famille P. Les courbes représentent la quantité d'ADN viral détecté dans l'eau de mer pour les individus présentant de la mortalité (courbe orange) et les individus survivants à l'infection (courbe grise). N=3 et N=7 respectivement par temps et par groupe. Les barres d'erreurs représentent l'écart type standard.

Dans le but de déterminer si, l'excrétion était identique entre des individus présentant des mortalités et des individus survivants au sein de la famille P, nous avons analysés séparément la quantité d'ADN virale détectée dans l'eau de mer pour les individus survivants (n=3) versus les individus morts (n=7). Les résultats montrent une différence significative entre les deux groupes d'individus de la famille P (Test de Mann-Whitney, $p < 0.05$) (**Figure 20**, p147). Le groupe d'individus survivants ne présente qu'un seul pic d'excrétion virale entre 32 et 72 hpi et aucune détection d'ADN viral n'a été observée dans l'eau de mer après 72 hpi. Ce résultat soulève la question du devenir du virus chez les individus survivants et de la persistance du pouvoir infectieux d'OsHV-1 dans l'eau de mer. Shimizu et coll. (2006) rapportent que le pouvoir infectieux du CyHV-3 (Cyprinid herpesvirus-3) est capable de persister au moins 24 h dans l'eau, mais qu'en l'absence d'hôtes, le virus est rapidement inactivé.

La détection de l'ADN viral ne permet pas d'explorer la production de particules intègres enveloppées et infectieuses. En effet, l'ADN détecté peut être libre ou bien contenu dans une particule virale intègre ou dégradée. Seules les particules intègres possédant leur enveloppe sont capables de pénétrer dans les cellules hôtes et de s'y répliquer. L'exposition d'animaux au virus apparaît comme une solution de choix pour explorer la conservation du pouvoir infectieux du virus. Schikorski et coll. (2011a) rapportent des mortalités chez les individus sains dès un jour après la mise en contact avec des individus infectés, suggérant une excrétion de particules virales infectieuses entre 48 et 72 hpi (les animaux infectés ont été injectés 48 heures avant d'être mis en contact des huîtres saines). Par ailleurs, une technique basée sur l'utilisation du monoazide de propidium (PMA), un intercalant de l'ADN, a été récemment développée à l'Ifremer (LGPM, La Tremblade) afin de mesurer les quantités de capsides intègres. En effet, le PMA pénètre uniquement à l'intérieur des virus dont la capside est endommagée et se lie à l'ADN viral de manière covalente suite à une exposition à une source lumineuse. Seul l'ADN des virus ayant une capside intègre est alors amplifié par PCR en temps réel. Cependant, cette technique, d'intérêt majeur pour le suivi des capsides intègres dans l'eau de mer ou/et dans l'hôte, ne renseigne pas sur l'état de l'enveloppe virale.

En fin d'expérience (144 hpi), les animaux survivants de la famille P ont été mis en contact dans un même bac avec des animaux sains de la famille A. L'objectif était d'explorer la capacité des animaux survivants à excréter des particules virales infectieuses pouvant engendrer de la mortalité. Après 15 jours de cohabitation, aucune mortalité n'a été observée, suggérant que les huîtres survivantes n'excrétaient plus de virus intègre 144 hpi. Néanmoins, nos résultats montrent également que ces mêmes individus libèrent de l'ADN viral entre 32 et 72 hpi, suggérant que des huîtres ne présentant pas de mortalités peuvent être considérées comme une source du virus. Chez les vertébrés, El-Matbouli et Soliman (2011) décrivent une transmission horizontale entre différentes espèces de poisson sensibles ou non à l'herpèsvirus CyHV-3. Ainsi, des poissons ne présentant aucune mortalité à CyHV-1 sont capables de transmettre l'infection à d'autres poissons.

Nos résultats soulèvent plusieurs questions, (i) le système immunitaire des huîtres survivantes permet-il d'éliminer totalement le virus, ou bien (ii) le virus est-il capable d'entrer en

latence/persistance chez ces huîtres, et dans ce cas, est-il possible d'observer un nouveau cycle actif du virus au sein de ces individus ?

*Dans notre étude, les huîtres survivantes n'ont pas été placées en conditions de stress. Or, chez les vertébrés, des travaux montrent qu'une variation de la température de l'eau peut agir comme un facteur de stress affectant le système immunitaire des poissons rouges (porteurs sains du virus CyHV-3) et ainsi favoriser la réplication du virus CyHV-3 et sa transmission par cohabitation à des carpes saines (El-Matbouli et Soliman, 2011). De plus, il a été montré précédemment que la mortalité des huîtres creuses due au virus OsHV-1 dépend de la variation de la température de l'eau de mer (Dégremont, 2013; Garcia *et al.*, 2011; Le Deuff *et al.*, 1996; Renault *et al.*, 2014). Dans le cas d'une persistance du virus chez les huîtres survivantes, ces dernières pourraient jouer un rôle majeur dans la transmission virale en milieu naturel.

Des études complémentaires basées sur une variation de paramètres environnementaux (température, oxygène, salinité) seront nécessaires pour préciser la persistance du virus dans l'hôte et les conditions de sa possible réactivation.

III. Existe-il des différences de sensibilité à l'infection OsHV-1 au stade larvaire ?

La recherche d'ARNm viraux a également été entreprise chez des larves de seconde génération des familles A et P, A-G2 et P-G2. Ces deux familles ont été sélectionnées car elles présentaient des sensibilités contrastées face à l'infection à OsHV-1 (**article 3**, p131), la famille A étant la famille présentant le plus de mortalité durant l'infection à OsHV-1.

L'étude des transcrits viraux d'OsHV-1 durant une infection expérimentale chez les larves semble d'intérêt, car contrairement à une infection chez le naissain, la réplication virale chez les larves pourrait être considérée comme plus synchrone. En effet, le nombre de cellules chez les larves est limité et la présence de virus dans la grande majorité des cellules à ce stade de développement a pu être montrée. Chez le naissain, l'infection virale apparaît plus se développer sous forme de foyers dans différents organes cibles. De plus, ce modèle permettrait de réaliser des infections expérimentales plus représentatives des conditions naturelles de l'infection en utilisant une contamination par balnéation. Une vingtaine d'essais de production de larves axéniques à partir des géniteurs de la famille A ou P ont été réalisés. Seuls deux ont pu être menés jusqu'à l'infection expérimentale. La production de larves axéniques reste délicate à mettre en oeuvre et différents paramètres doivent être pris en compte comme le niveau de maturation des géniteurs ou encore la qualité de l'eau de mer. Lorsque les larves ont atteint six jours après fécondation, deux conditions ont été testées : la condition contrôle avec des larves non infectées par la suspension virale versus des larves mises en contact avec la suspension virale. Les temps de prélèvements des larves ont été 12h et 26h post infection. Les ADN et les ARN de pools de larves ont été extraits et testés par PCR en temps réel. Nous avons sélectionnés trois gènes viraux suite à l'étude ciblant 39 gènes viraux chez le naissain : ORF 7 (hélicase), ORF 25 (protéine membranaire putative), et l'ORF 87 (IAP).

Des mortalités ont été observées dès 12 hpi pour les larves de la famille A-G2. Au contraire, aucune mortalité n'a été détectée 48 hpi pour les animaux de la famille P-G2. Les résultats obtenus en PCR en temps réel pour la détection de l'ADN viral ont mis en évidence que la

réplication virale était effective chez les larves des deux familles. L'expression des gènes viraux était plus élevée chez les individus de la famille P-G2 que chez ceux de la famille A-G2. Ce résultat pourrait être expliqué par le fait que les larves de la famille A-G2 ont présenté des mortalités dès 12 hpi. Les ARN viraux auraient pu être dégradés rapidement chez ces larves, alors que l'ADN viral plus stable serait plus aisément détectable. Ainsi, nous avons pu montrer que la réplication virale était observée chez des larves sensibles (présentant des mortalités 12 hpi) et moins sensibles (ne présentant aucune mortalité). De plus, le comportement observé pour les animaux de la première génération (individus de la famille A étaient plus sensibles à l'infection virale en conditions expérimentales que les individus de la famille P) semble le même au stade larvaire pour les individus de la seconde génération.

Ce travail est présenté dans l'**article 4** (Viral infection and OsHV-1 RNA detection in larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, soumis à Journal of Invertebrate Pathology, en juillet 2014)

IV. Conclusion du chapitre 2

Cette partie a été consacrée à la réalisation d'essais d'infection expérimentale *in vivo* au travers de matériel présentant différentes sensibilités à l'infection à OsHV-1 (sur la base des mortalités observées après inoculation d'une suspension virale). L'ensemble de ce travail permet d'obtenir de nouvelles informations sur les interactions entre l'hôte *C. gigas* au stade naissain ou larvaire, et son agent infectieux OsHV-1.

Ainsi, ce chapitre visait à répondre aux questions suivantes :

Q3. Est-il possible de mettre en évidence des différences transcriptomiques de gènes viraux et cellulaires chez des familles d'huîtres creuses au stade naissain?

Oui, le suivi de gènes viraux et cellulaires au sein des familles d'huîtres creuses a mis en évidence des différences en termes de multiplication virale et de réponse immunitaire. Bien que nos résultats aient montré que le niveau d'expression des gènes viraux était significativement différent entre les deux familles, le cycle de réplication d'OsHV-1 semble être identique entre ces familles. Ainsi, les 39 gènes sont exprimés chez les deux familles au cours de l'infection. Les individus moins sensibles ne sont pas réfractaires à l'infection. Les temps de prélèvements pour les individus de la famille la moins sensible peuvent également être discutés. En effet, entre 26 et 72 hpi, le niveau d'expression des gènes viraux chez cette famille est peut être identique à celui de la famille la plus sensible. Cependant, l'absence de transcrits viraux en fin d'expérience suggère que le virus ne se réplique plus ou que cette réplication n'est plus détectable chez les individus survivants (famille P). Les individus survivants à l'infection et porteurs du virus pourraient alors être un réservoir pour OsHV-1 dans l'environnement. Néanmoins, l'hypothèse d'individus éliminant totalement le virus ne peut pas être exclu. Cependant, dans les deux cas (persistance ou élimination du virus), l'huître apparaît capable de mettre en place un système de défense immunitaire efficace contre l'infection virale.

La multiplication virale était corrélée avec le niveau d'expression des gènes IFI44 et de IAP pour les deux familles, mais également avec le gène MyD88 et Ikb2 chez la famille la plus sensible à l'infection à OsHV-1. Enfin, 26 hpi, l'expression des gènes cellulaires suivie est

différente entre les individus appartenant aux deux familles : sous-expression pour les individus de la famille la plus sensible et surexpression pour ceux de la famille la moins sensible (**Figure 21**, p166). La régulation de ces gènes cellulaires pourrait notamment expliquer la différence de sensibilité à l'infection entre les animaux des deux familles.

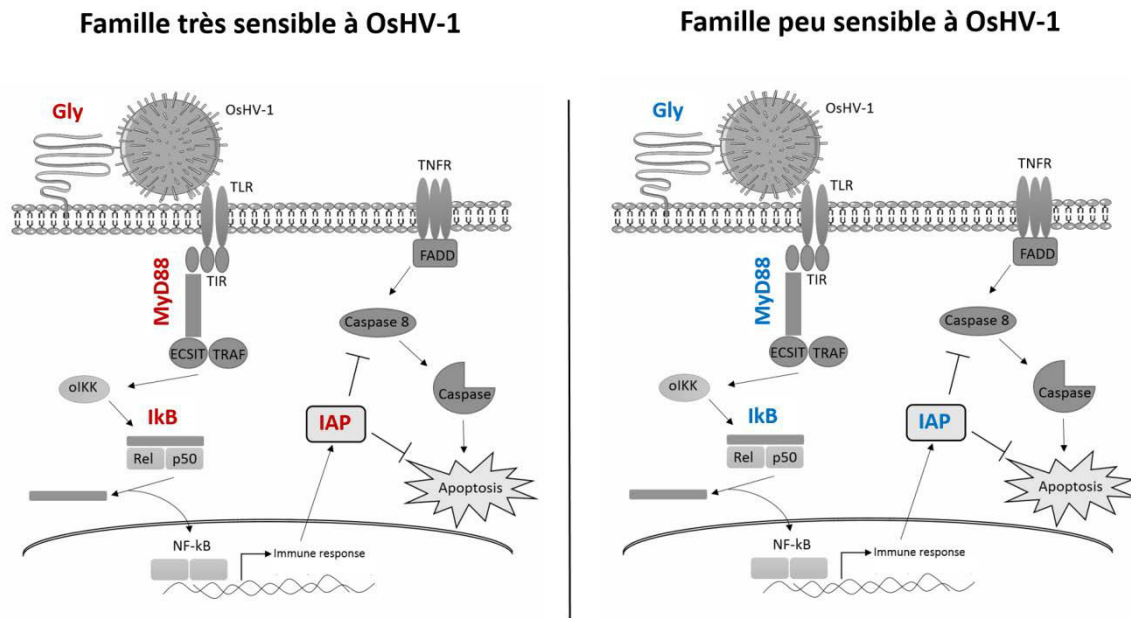


Figure 21: Schéma simplifié de l'expression des gènes cellulaires étudiés chez la famille sensible et moins sensible à 26 hpi. Gly : Glypican, MyD88 : Myeloid factor differentiation 88, Ikb2 : , IAP : Apoptosis inhibitor. En bleu sont représentés les gènes sous exprimés et en rouge les gènes sur-exprimés d'une famille par rapport à l'autre.

Q4. Est-il possible de détecter une excrétion différentielle d'ADN viral au cours d'une infection expérimentale chez ces familles d'huîtres creuses (résultats complémentaires) ?

Oui, les résultats complémentaires mettent en évidence l'excrétion d'ADN viral pour les deux familles. Ils suggèrent que tous les individus (les plus sensibles et les moins sensibles) soient capables de produire des virus, de les excréter et ainsi de transmettre l'infection. L'absence d'ADN viral détecté dans l'eau de mer pour les huîtres survivantes appuie l'hypothèse que la réplication virale est ralentie ou stoppée chez ces individus. Le devenir du virus reste une question en suspens. Cette observation pourrait s'expliquer par l'entrée en latence/persistance du virus OsHV-1.

Q5. Existe-il des différences de sensibilités à l'infection OsHV-1 au stade larvaire ?

Oui hypothétique. Alors que des études suggèrent que les larves et les jeunes stades possèdent un système immunitaire rudimentaire et immature (Jenkins *et al.*, 2013), nos résultats montrent que les larves issus d'une famille peu sensible à l'infection virale sont capables de survivre à l'infection par OsHV-1. Néanmoins, de l'ADN viral et des ARN viraux ont également été détectés chez ces individus. Ce résultat laisse suspecter une infection à bas bruit et sans mortalité chez ces animaux.

Ainsi, nous suggérons que la sensibilité des huîtres à OsHV-1 n'est pas uniquement liée au stade de développement de l'huître, mais surtout à son patrimoine génétique.

CHAPITRE 3 : MODULATION DE LA SENSIBILITE DES HUITRES CREUSES A L'INFECTION VIRALE PAR UNE APPROCHE D'ARN INTERFERENCE



I. Est-il possible de moduler la sensibilité chez des huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, face au virus OsHV-1 ?

I.1 Introduction

Dans le but d'explorer les bases moléculaires de la survie de l'huître creuse, Fleury et coll. (2009) ont sélectionnés 9058 gènes pour produire une puce à ADNc spécifique de *C. gigas*. Cette puce a servi à la comparaison transcriptomique de familles d'huîtres présentant des taux de mortalité contrastée en période estivale. Parmi ces gènes, 34 étaient exprimés de manière différenciée entre les familles au cours de la période précédant les mortalités. Sur la base de leur annotation, ces 34 gènes ont pu être répartis en quatre catégories fonctionnelles (GO): la reproduction, le métabolisme énergétique, le stress oxydatif et l'immunité. Il est apparu que les dix gènes impliqués dans l'immunité étaient surreprésentés chez les huîtres les moins sensibles (versus les plus sensibles) au syndrome de mortalité estivale. Cette observation a été faite juste avant le pic de mortalité observé sur l'estran. Parmi ces gènes, le gène IκB codant pour un inhibiteur de la voie NF-κB était sous-exprimé chez les huîtres peu sensibles comparées à celles les plus sensibles au syndrome de mortalité estivale. En 2008, Montagnani et coll. ont caractérisé un gène comme appartenant à la famille des IκB chez l'huître creuse et présentant des homologies avec des séquences rapportées chez d'autres espèces. Le gène IκB a été également caractérisé chez d'autres mollusques comme le pétoncle, *Argopecten irradians* (Mu *et al.*, 2010) ou l'huître perlière, *Pinctada fucata* (Zhang *et al.*, 2009). Zhang et coll. (2011) ont rapporté l'existence chez *C. gigas* de deux gènes homologues, Cg-IκB1 et Cg-IκB2, possédant les domaines caractéristiques des membres de cette famille. Le gène Cg-IκB2 qui a été retrouvé exprimé de manière différenciée entre des huîtres présentant des mortalités contrastées sur estran en période estivale (Fleury et Huvet, 2012).

Afin d'étudier le rôle de ce gène, le Laboratoire de Physiologie des Invertébrés (LPI, Ifremer, Brest), a mis en œuvre des expériences d'inhibition de l'expression de ce gène par ARN interférence (par injection d'ARN double brin spécifique : ARNdb, **Annexe 2**, p273). Le LPI a développé cette technique chez *C. gigas* depuis 2009 (Fabioux *et al.*, 2009). L'inhibition d'un gène par ARNi est réversible et réalisée au moment souhaité. En effet, le gène est

toujours présent, sa transcription peut s'effectuer, mais les ARNm produit sont dégradés spécifiquement conduisant à l'absence ou la réduction quantitative de la protéine correspondante suite à l'injection d'ARNdb.

Dans le cadre de mon travail de thèse, après injection ARNdb spécifique du gène Cg-I κ B2, une infection expérimentale (injection d'une suspension virale) a été réalisée 24 h après dans le but d'observer le comportement des huîtres vis à vis de l'infection à OsHV-1. Nous avons suivi chez les individus infectés par le virus, l'expression de gènes viraux et cellulaires après injection ou non d'ARNdb.

Cette approche d'ARNi visant à inhiber un inhibiteur de la voie NF- κ B, Cg-I κ B2, a permis d'obtenir du matériel biologique contrasté en termes de sensibilité à l'infection virale. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Laboratoire Physiologie des Invertébrés (LPI, Ifremer, Brest). Ce travail fera prochainement l'objet d'une publication en complément des résultats obtenus par le LPI.

I.2 Matériel et méthodes

I.2.A. Animaux

En mai 2012, des huîtres creuses, *C. gigas*, ont été produites à l'écloserie Ifremer d'Argenton (Finistère, France) comme décrit par Petton et coll. (2013), puis élevées à la station Ifremer de Bouin (Poitou-Charentes, France). En novembre 2012, 400 huîtres (âgées de six mois et pesant environ 4 g) ont été transférées dans les infrastructures d'élevage du centre Ifremer (Plouzané) et acclimatées pendant quatre jours (augmentation d'un degré par jour pour atteindre 20°C, eau de mer filtrée à 1 μ m) avant d'être utilisées pour les essais.

I.2.B. Synthèse d'ARN double brin

Le protocole utilisé a été celui décrit précédemment par Fabioux et coll. (2009). Un pool d'ARN total extrait à partir d'un broyage de l'ensemble des tissus de dix huîtres collectées dans le bassin de Marennes-Oléron a été utilisé comme matrice et amplifié par RT-PCR afin d'obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc). Un fragment de 312 pb de la séquence codante du gène Cg-IkB2 (Genbank n° HQ650768) de l'huître creuse a pu ensuite être amplifié à partir de cet ADNc, par PCR avec le couple d'amorces IPK : sens: 5' - GGATTTGAACGACCTGGAAG- 3', anti-sens : 5' -GCAGACGACTCGTTTTTCATC- 3' (Huvet *et al.*, communication personnelle). La taille du fragment obtenu a été analysée sur gel d'agarose. Ce fragment a été sous-cloné dans le vecteur pCR4 -TOPO (Invitrogen), puis séquencé pour vérification. Les plasmides recombinants ont été purifiés en utilisant le kit de purification d'ADN plasmidique NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel) et dosés au spectrophotomètre (Nanodrop 1000 ND, Thermo Fisher Scientific). Ces plasmides ont été linéarisés avec les enzymes NotI ou SpeI (Promega), puis extraits au phénol-chloroforme, précipités en l'éthanol et remis en suspension dans l'eau sans RNase. Les produits de linéarisation ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Les deux brins du plasmide purifié ont été transcrits *in vitro* en utilisant le kit T7 et T3 MEGAscript (Ambion) pour produire les ARN simple brin (ARNsb) sens et anti-sens du gène Cg-IkB2. Ces ARNsb ont été extraits par phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol et remis en suspension dans de l'eau sans RNase. Après quantification par spectrophotométrie (Nanodrop 1000 ND ; Thermo Fisher Scientific), des quantités équimolaires d'ARNsb sens et anti-sens ont été chauffées dans un bain marie à 100°C pendant 1 min et laissées à refroidir pendant 10 h jusqu'à atteindre la température ambiante. L'ARNdb obtenu a été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % afin de s'assurer qu'il n'existait qu'une seule bande de taille attendue (312 pb) et a été dosé au spectrophotomètre (ARN double brin à la concentration de 2 µg/µL).

I.2.C. Plan expérimental

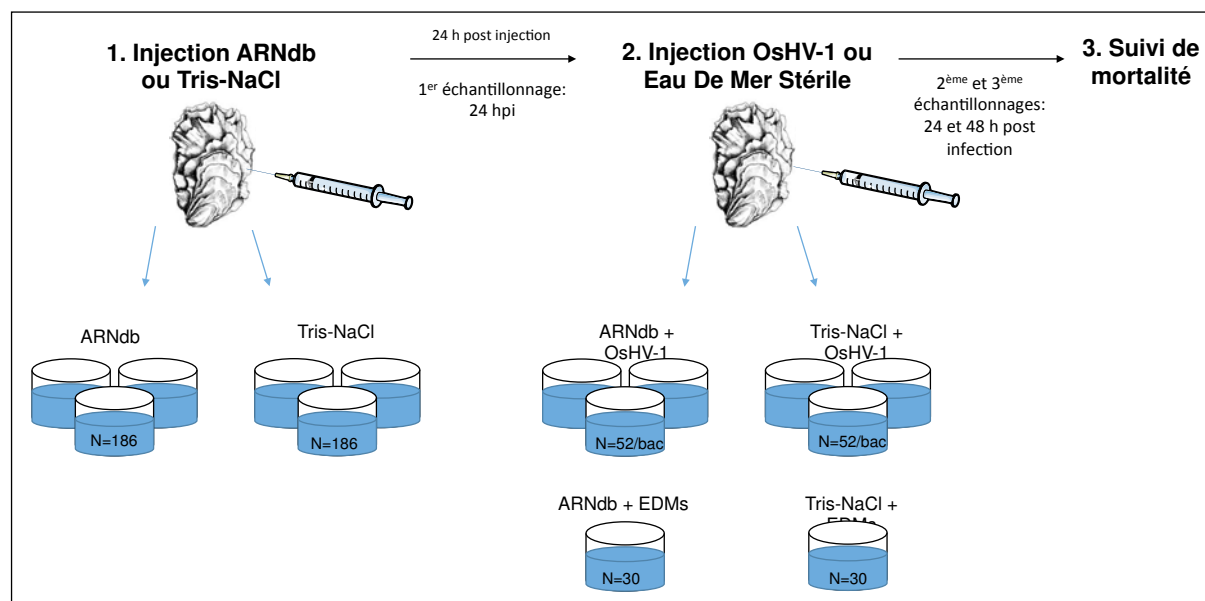


Figure 22: Plan expérimental d'injection des ARNdb et de l'infection par OsHV-1 chez du naissain de *Crassostrea gigas*

L'expérience a été menée sur du naissain d'huître creuse (**Figure 22**, p174). Afin d'être « anesthésiées », 372 huîtres ont été plongées durant 4 h dans une solution contenant du chlorure de magnésium (MgCl_2 , 50 g/L), de l'eau de mer stérile (1 vol) et de l'eau douce (4 vol) (Schikorski *et al.*, 2011b). Cent quatre-vingt-six huîtres « anesthésiées » ont été injectées soit avec 100 μL d'ARNdb (1 $\mu\text{g/g}$ de poids total d'huître) dilué dans du Tris-NaCl, soit avec 100 μL de solution saline Tris-NaCl servant de contrôle. La moitié du volume des 100 μL ARNdb ou Tris-NaCl a été injectée dans la gonade (50 μL) et l'autre moitié (50 μL) dans le muscle adducteur. Ensuite, les huîtres ont été placées à $20 \pm 1^\circ\text{C}$ dans des bacs de 30 L contenant de l'eau de mer filtré (1 μm) (**Figure 22**, p174).

Vingt-quatre heures après injection des ARNdb ou du Tris-NaCl seul, 100 μL d'une suspension d'OsHV-1 ajustée à 10^4 copies d'ADN viral/ μL ont été injectés dans le muscle adducteur de chaque individu à l'aide du seringue 1 mL. Les huîtres ont ensuite été placées à $20 \pm 1^\circ\text{C}$ dans trois bacs (52 huîtres par bac et par condition) contenant 30 L d'eau de mer filtré (1 μm). Des témoins injectés avec de l'eau de mer (100 μL) ont été réalisés pour les conditions ARNdb et Tris-NaCl, puis placés pour chacune des conditions dans un autre bac

(30 huîtres par conditions afin d'être à la même densité pour le suivi de mortalité post-prélèvement) (**Figure 22**, p174).

Des prélèvements de cinq huîtres par bac (soit 15 par condition) ont été réalisés pour les animaux injectés ARNdb et Tris-NaCl seul (avant l'infection d'OsHV-1 ou d'eau de mer), puis 24 et 48 h post-infection pour les conditions « ARNdb + OsHV-1 » et « Tris-NaCl seul + OsHV-1 » (**Figure 22**, p174).

Pour chaque prélèvement, un fragment de branchie a été collecté et conservé dans de l'azote liquide pour une extraction ultérieure d'ARN totaux et un fragment de manteau a été placé dans de l'éthanol afin de quantifier l'ADN viral par PCR en temps réel, 24 h et 48 h post-injection de la suspension virale. Un suivi de la mortalité a été réalisé sur la durée de l'expérience, soit 12 jours.

L'ADN total a été extrait tel que décrit précédemment (Schikorski *et al.*, 2011b). La détection et la quantification de l'ADN viral a été réalisée en triplicats par PCR en temps réel d'après le protocole établi par Pepin et coll. (2008).

I.2.D. Extraction d'ARN et synthèse d'ADN complémentaire

Chaque prélèvement a été broyé (broyeur de type DANGOUMAU) en azote liquide (-196°C), puis 30 mg de la poudre obtenue ont été utilisés pour extraire les ARN totaux dans 1,5 mL de solution d'extraction (Extract-All solution, Eurobio). Les ARN totaux ont été traités avec le kit DNase RTS (BIO - MO) selon les instructions du fabricant. Des réactions de PCR en temps réel ont été réalisées après traitement à la DNase (ARN dilué au 1/10) en utilisant les amorces ciblant le facteur d'élongation 1 (Fabioux *et al.*, 2004) dans le but de vérifier l'absence d'ADN contaminant. Tous les ARN totaux ont ensuite été analysés au spectrophotomètre (Nanodrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific) à 260 nm pour être quantifiés, puis au bioanalyser afin de vérifier la qualité de chaque échantillon d'ARN extrait (Agilent ARN 6000 Nano Reagents, Agilent). La transcription inverse a été ensuite réalisée avec l'enzyme M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus, Sigma) en présence d'oligo-dT suivant le protocole décrit par Fabioux *et al.* (2004).

I.2.E. PCR en temps réel et expression de gènes viraux et cellulaires

La PCR en temps réel a été réalisée en utilisant l'appareil Mx3000 Thermocycleur (Agilent). Le volume final de chaque réaction était de 20 μ L. Chaque puit contenait 5 μ L d'ADNc de dilution (1/20), 10 μ L de Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green Master Mix (Agilent), 2 μ L de chaque amorce (3 μ M) et 1 μ L d'eau distillée. Les conditions de cycle ont été les suivantes: 3 minutes à 95°C, 40 cycles d'amplification à 95°C pendant 5 s, 60°C pendant 20 s. Des courbes de dissociation ont été également tracées (55-95°C), afin de vérifier l'amplification spécifique pour chaque couple d'amorces. Les contrôles négatifs (avec de l'eau stérile) ont été également inclus pour rechercher d'éventuelles contaminations.

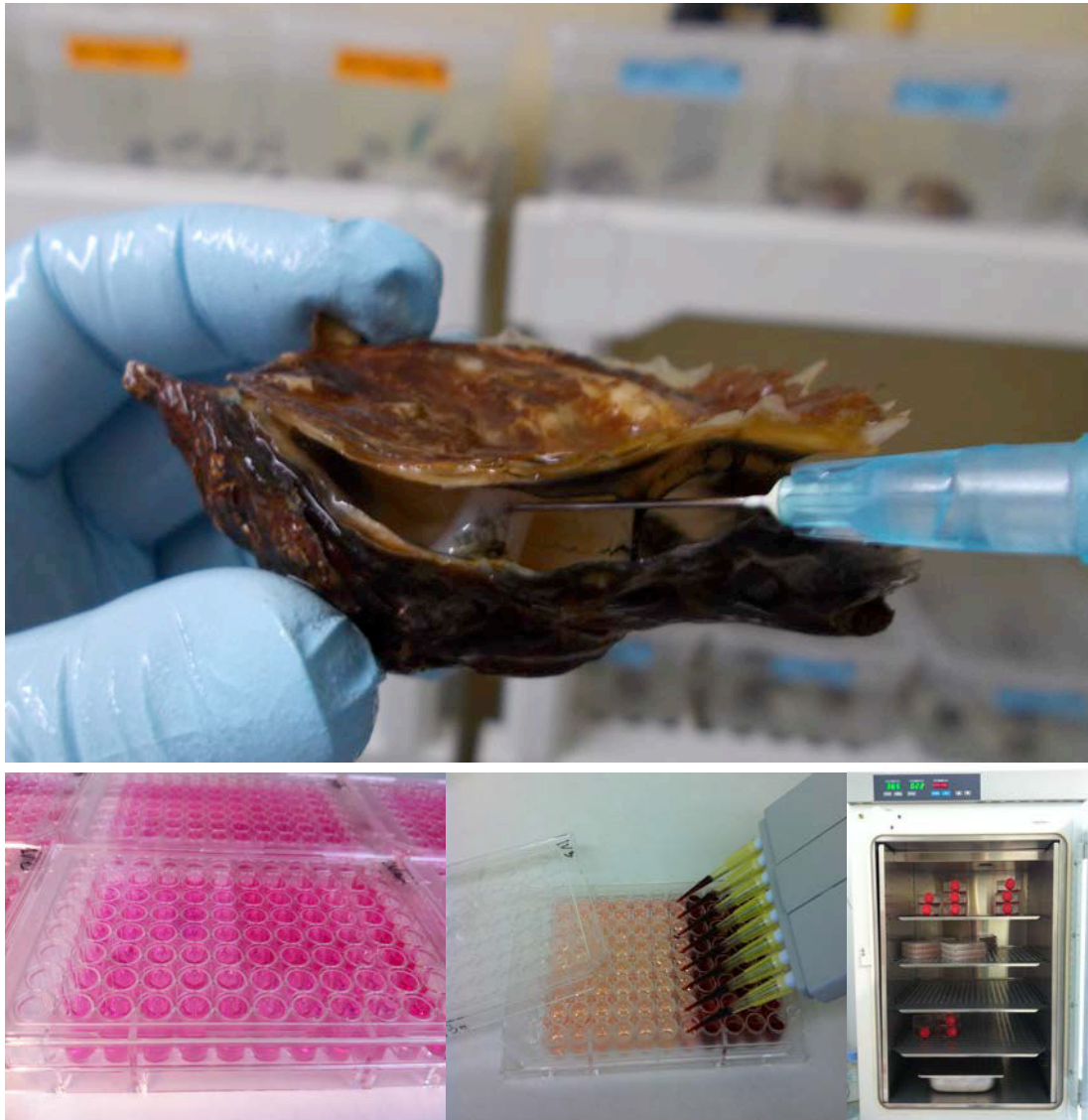
Le suivi de l'expression de gènes viraux a été réalisé en utilisant les 39 couples d'amorces préalablement dessinés et standardisés par (Segarra et al., 2014a). Le niveau d'expression des gènes a été calculé pour chaque individu avec la formule : $F = \log_{10}[(E+1)^{40-Ct}/N]$ adapté de De Decker et coll. (2013) où E est l'efficacité pour chaque ORF, Ct correspond au nombre de cycles de PCR, N est le nombre maximal de copies d'ADN viral / μ L d'ADN total détecté moins le nombre de copies d'ADN viral / μ L d'ADN total détecté pour chaque individu. Ct = 40 a été arbitrairement considérée comme correspondant à « aucune détection » obtenu par PCR en temps réel.

La PCR en temps réel a également été utilisée pour suivre l'expression de cinq gènes d'intérêt de *C. gigas* incluant (i) le myeloid differentiation factor 88 (MyD88), (ii) le NF kappa-B inhibitor cactus (Ikb2), (iii) l'interferon-induced protein 44 (IFI44), (iv) le Glypican (Gly) et (v) la Baculoviral apoptosis inhibitor repeat-containing protein 2 (IAP) (Segarra et al., 2014b), article 3). L'efficacité de chaque couple d'amorces a été déterminée par PCR en temps réel (Segarra *et al.*, 2014a, article 1). Le niveau d'expression relative (R) a été calculé selon la méthode décrite par Pfaffl, 2001 $R = [(E_{\text{target}})^{\Delta CT_{\text{target(control-sample)}}}] / [(E_{\text{EF}\alpha-1})^{\Delta CT_{\text{EF}\alpha-1 \text{ (control-sample)}}}]$. Le gène de référence sélectionné pour la normalisation est le facteur d'élongation I (EF) (CV = 4.6%, Kruskal-Wallis test Z = 0.8, p > 0.05) et le calibrateur pour l'expérience est un pool d'ADNc prélevé au cours du premier échantillonnage, soit 24 hpi ARNdb ou Tris-NaCl seul (avant injection de la suspension virale).

I.2.F. Analyses statistiques

Les courbes de survie (Kaplan-Meier) et le test de Wilcoxon ont été utilisés pour comparer les différentes conditions. Une carte type « heatmap » a été générée grâce au logiciel R afin de représenter l'expression des gènes viraux pour les deux conditions. Le regroupement des gènes viraux a été réalisé en utilisant la méthode euclidienne. Les résultats pour l'expression relative de gènes cellulaires ont été exprimés en boîte à moustache et un test de Mann-Whitney a été utilisé pour analyser l'expression de ces gènes. Les corrélations entre la quantité d'ADN viral et l'expression de chaque gène cellulaire ont été testées en utilisant le test non paramétrique rho de Spearman. Tous les calculs statistiques ont été effectués avec le logiciel XLSTAT (version 2013), et les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs lorsque $P < 0,05$.

CHAPITRE 4: INFECTION VIRALE EN CONDITIONS EXPERIMENTALES ET L'HUITRE CREUSE, *CRASSOSTREA GIGAS*, AU STADE ADULTE



I. L'huître creuse, est-elle résistante à l'infection au stade adulte ?

Bien que la détection d'OsHV-1 chez l'huître creuse concerne essentiellement les stades larvaire et naissain, des auteurs ont mis en évidence la présence de ce virus chez des huîtres adultes (Arzul *et al.*, 2002; Barbosa-Solomieu *et al.*, 2004). D'autres bivalves aux stades adultes tel que *C. virginica* (Farley *et al.*, 1972) et *O. angasi* (Hine et Thorne, 1997) ont également été décrits comme porteurs asymptomatiques d'un virus de type herpès. Ainsi, les bivalves adultes semblent moins sensibles aux infections à herpèsvirus que les plus jeunes. Ce constat a pu également être montré chez le poisson chat infecté par l'herpèsvirus CCV (channel catfish virus) et chez le saumon du Japon adultes infectés par le virus *Oncorhynchus masou* (Kimura *et al.*, 1981; Plumb, 1973; Wise *et al.*, 1988).

De plus, les herpèsvirus sont connus pour persister de façon latente chez l'hôte en ne présentant aucun signe clinique visible.

Dans ce contexte, cette partie de thèse concerne la réplication d'OsHV-1 chez les huîtres creuses adultes lors d'une infection expérimentale *in vivo*. Notre étude a consisté à inoculer une suspension virale chez deux groupes d'huîtres creuses adultes, A1 et A2, âgées respectivement de 19 mois et deux ans. La mortalité et la quantité d'ADN viral ont été suivies chez ces deux groupes. Enfin, le suivi de l'expression de gènes viraux et cellulaires a été réalisé chez le groupe A1 à 0.5, 10, 26, 72, et 144 heures après injection de la suspension virale.

Pour la première fois, cette approche a permis de mettre en évidence des mortalités au stade adulte suite à une infection expérimentale par OsHV-1. L'analyse des individus révèle également que ces individus étaient initialement porteurs d'ADN viral. L'injection virale réalisée au cours de cette étude a probablement provoqué une surinfection par OsHV-1 chez ces huîtres adultes.

Néanmoins, la quantité d'ADN viral a diminué à partir de 10 et 26 hpi respectivement chez ces deux groupes. Pour le groupe A1, cette quantité a même atteint un seuil comparable à

celui observé chez les adultes contrôles (eau de mer) à 72 et 144 hpi. Nous avons donc sélectionné ce groupe pour étudier l'expression des gènes viraux et cellulaires. Ces travaux soulignent un faible taux de transcrits viraux et donc une faible réplication d'OsHV-1 10 et 26 hpi, suivie de l'absence de détection d'ADN viral à partir de 72 et 144 hpi. L'étude de l'expression de gènes cellulaires impliqués dans l'immunité révèle notamment une très forte surexpression du gène IAP chez les huîtres expérimentalement infectées versus les huîtres contrôles. A contrario, l'expression du gène IFI44 est plus importante chez les huîtres contrôles que les huîtres expérimentalement infectées (**Article 5**).

Le second objectif de ce travail était de mettre en évidence des activités antivirales chez les huîtres creuses adultes suite à une stimulation par une injection d'une suspension virale. En raison du manque de lignées cellulaires de mollusques marins, l'activité antivirale de l'hémolymphe d'huîtres creuses adultes a été testée vis-à-vis d'un herpèsvirus humain, HSV-1, en utilisant des cellules Véro (cellules de type fibroblastique). Le choix de ce modèle hétérologue s'explique d'une part par le fait que des particules virales d'OsHV-1 ont été observées dans des cellules de type fibroblastique chez *C. gigas* (Renault *et al.*, 1994b). Le virus HSV-1 possède quant à lui, des homologies avec OsHV-1 dans l'organisation de son génome (Davison *et al.*, 2005). De plus, ce modèle hétérologue a été préalablement utilisé avec succès pour rechercher des activités antivirales chez les mollusques marins, l'huître creuse et l'ormeau (Green *et al.*, 2014; Olicard *et al.*, 2005a, 2005b; Zeng *et al.*, 2008). La présence dans l'hémolymphe des mollusques marins d'activités antivirales vis-à-vis de différents virus a ainsi été montrée, et des activités anti HSV-1 plus élevée ont été détectées pendant l'été (Dang *et al.*, 2011; Olicard *et al.*, 2005b).

L'hémolymphe d'huîtres creuses des groupes A1 et A2 a été prélevé 0, 0.5, 10, 26, 72 et 144 heures post infection, puis centrifugée séparément et mis en contact avec des cellules Véro pendant 42, 72 et 96 h afin de rechercher des activités antivirales induites spécifiquement au cours d'une infection expérimentale. De l'hémolymphe d'huîtres n'ayant pas reçu d'injection de suspension virale constituait un contrôle négatif pour l'ensemble des mesures réalisées. L'activité antivirale a été suivie et analysée par densité optique utilisant la méthode de coloration au rouge neutre. Les expériences de mise en contact ont été réalisées en triplicat pour les deux groupes d'huîtres adultes. Nos résultats n'ont pas mis en évidence des

différences significatives d'activités antivirales entre les huîtres contrôles et expérimentalement infectées (**Article 5**: Ostreid herpesvirus type 1 replication and host response in adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, Veterinary Research).

Ces travaux sont rapportés dans l'**article 5** accepté dans Veterinary Research, septembre 2014.

Article 5

Ostreid herpesvirus type 1 replication and host response in adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*

Amélie Segarra¹, Laury Baillon¹, Delphine Tourbiez¹, Abdellah Benabdelmouna¹, Nicole Faury¹, Nathalie Bourgougnon², Tristan Renault^{1,*}

*Corresponding author

Email: Tristan.Renault@ifremer.fr

¹ Ifremer (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer), Unité Santé Génétique et Microbiologie des Mollusques (SG2M), Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins (LGPM), Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France

² Université de Bretagne Sud (UBS), Centre d'Enseignement et de Recherche Yves Coppens, Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines EA3884 (LBCM), Université Européenne de Bretagne (UEB), Campus de Tohannic, BP573, 56017 Vannes Cedex, France

Abstract

Since 2008, massive mortality outbreaks associated with OsHV-1 detection have been reported in *Crassostrea gigas* spat and juveniles in several countries. Nevertheless, adult oysters do not demonstrate mortality in the field related to OsHV-1 detection and were thus assumed to be more resistant to viral infection. Determining how virus and adult oyster interact is a major goal in understanding why mortality events are not reported among adult Pacific oysters. Dual transcriptomics of virus-host interactions were explored by real-time PCR in adult oysters after a virus injection. Thirty-nine viral genes and five host genes including MyD88, IFI44, Ikb2, IAP and Gly were measured at 0.5, 10, 26, 72 and 144 hours post infection (hpi). No viral RNA among the 39 genes was detected at 144 hpi suggested the adult oysters are able to inhibit viral replication. Moreover, IAP gene (oyster gene) showed significant up-regulation in infected adults compared to control adults. This result suggests that over-expression of IAP could be a reaction to OsHV-1 infection, which may induced the apoptotic process. Apoptosis could be a main mechanism involved in disease resistance in adults. Antiviral activity of haemolymph against herpes simplex virus (HSV-1) was not significantly different between infected adults versus control.

Introduction

In 1972, virus particles morphologically similar to herpesviruses were first reported in an invertebrate, the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*, from the USA [1]. Since then, the new family *Malacoherpesviridae* in the order *Herpesvirales* has been created in order to include a virus named ostreid herpesvirus type 1 (OsHV-1) infecting different bivalve species [2-4]. OsHV-1 is reported in mass mortality outbreaks observed among Pacific oysters less than one year old [5-8]. Considering the economic importance of shellfish culture, tools have been previously developed for rapid virus detection [5,9-12] and OsHV-1 genome has been fully sequenced from purified virus particles [3].

Since 2008, mass mortality outbreaks (with rates of up to 80%) have been reported in *C. gigas* spat and juveniles in Europe, New Zealand and Australia [13-15] and have been associated with virus variants [16-18]. OsHV-1 role in these mortalities has been underlined by experimental infection of *C. gigas* spat with viral suspension [19,20]. These abnormal mortalities have not occurred among *C. gigas* adults in France. Nevertheless, virus DNA and proteins can be detected in adult oysters in the absence of mortality [21,22]. Similar observations were reported in vertebrate herpesviruses such as channel catfish virus (CCV) in channel catfish adults [23], or *Oncorhynchus masou* virus in salmonid adults [24]. In vertebrates, the strategies that herpesviruses use to infect cells during lytic or latent infection have been studied intensively [25]. However, Information on these aspects of infection by OsHV-1 is rudimentary.

Oyster have an efficient defence mechanism based on innate immunity. Studies have demonstrated that the immune system of *C. gigas* is capable of recognizing of virus infection with resulting variations in expression of genes involved in virus recognition, signaling and immunity i.e. Myeloid Differentiation factor 88, Ikb2, Interferon-induced protein 44, Glypican and apoptosis inhibitor [26-29]. Due to the lack of molluscan cell lines for culturing OsHV-1, antiviral activities of molluscs are often tested against another virus, using a plaque assay [28,30-32]. *Crassostrea gigas* haemolymph contains a compound(s) that inhibits herpes

simplex virus type 1 (HSV-1) replication in Vero cell [28,30,31]. To date, investigations into in vitro antiviral responses of *C. gigas* after an OsHV-1 infection have not been undertaken.

Although experimental protocols have been developed recently to reproduce the viral infection in laboratory conditions [19,20] the dynamic processes of infection have not been studied in experimental conditions at the adult stage.

In this context, adult oysters appear as animals of interest to study interactions host and OsHV-1. Based on previous observations adult oysters are assumed to be more resistant to viral infection.

In this study, we have explored what happens in adult oysters after a virus injection through monitoring mortality, antiviral activities and viral and oyster gene expression.

Material and methods

Animals and experimental infection design

Two families of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, with different genetic backgrounds were used in this study. Two families, A1 and A2, were produced using different genitors (one male and one female for each family) in the Ifremer facilities located in La Tremblade (Charente Maritime, France) in 2010. They were characterized by high survival rates during their first year of life when spat were reared in the field [33]. Experimental infections were carried out using oysters from both families (two years old, 6 cm in length for A1 and 19 months old, 4 cm in length for A2). For each family, 240 oysters were “anaesthetized” during 4 h in a solution containing magnesium chloride (MgCl₂, 50 g/L) in seawater (1 v)/ distilled water (4 v) [34]. One hundred µL of an OsHV-1 (µVar [16]) suspension at 1.10⁶ copies of viral DNA/µL were injected into the adductor muscle of 120 oysters per family [19,20]. Similarly, 120 adults from each family were injected with 100 µL of sterile artificial seawater as controls. Pacific oysters were then placed in four tanks (30 oysters per tank/condition) containing 5 L of filtered seawater (1 µm) at 22 °C. One tank per condition was dedicated to survival record and the three other were dedicated to sample collection. The absence of bacterial contamination of the viral suspension was tested before each challenge. The viral suspension was spread onto Petri dish which contained marine agar and no bacteria were observed.

Twenty oyster spat (7 months old, 3 cm in length) were simultaneously injected in order to confirm that the virus suspension was infectious and mortality was monitored without sample collection. Spat were produced at the Ifremer facilities (La Tremblade, Charente Maritime, France) from wild oysters which were collected from the Marennes-Oléron Bay in January 2011.

Mortality was monitored during a period of 144 h and cumulative mortality was defined daily for each condition (oysters infected with OsHV-1 or injected with sterile artificial seawater).

Plasma and tissue sample collection

For both families (A1 and A2), haemolymph was collected from six live oysters with a sterile syringe (1 ml, Terumo) from the pericardial cavity and pooled for each tank, condition and family. These samples were collected at 0.5, 10, 26, 72 and 144 hours post-infection (hpi). Haemolymph pools were centrifuged at 300 rpm during 10 min at 4 °C then filtered at 0.22 µm in order to study antiviral activity. All plasma samples (without haemocytes) were stored at –80 °C.

Two pieces of mantle were sampled from two live individuals per tank (6 individuals per time/condition) from both families. A piece of mantle (50 to 100mg) was disposed in a tube containing 1 mL of TRIZOL® Reagent™ (Ambion®) and frozen at –80 °C for further RNA extraction. The second piece of mantle was directly frozen at –20 °C for DNA extraction.

DNA and RNA extraction and cDNA synthesis

DNA extraction was performed using a QiAamp tissue mini kit® (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol. Elution was performed in 100 µL of AE buffer provided in the kit.

Total RNA was extracted using TRIZOL® Reagent™ (Ambion®) according to the manufacturer's recommendation. Total RNA was treated with Turbo™ DNase (Ambion®) to remove genomic DNA. The RNA quality and quantity were determined using NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) and Bioanalyser 2100 (Agilent). First-strand cDNA synthesis was carried out using the SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) using 8000 ng of treated RNA. Reactions lacking RT were performed after each DNase treatment using real-time PCR in order to control absence of oyster and/or virus genomic DNA.

OsHV-1 DNA quantification

Viral DNA quantification was carried out by real-time PCR in duplicate using a Mx3000 Thermocycler (Agilent) according to previously described protocols [11,35]. Amplification reactions were performed in a total volume of 20 µL to study oyster gene or viral gene expression. Each well contained 5 µL of DNA, 10 µL of Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green PCR Master Mix (Agilent), 2 µL of each primer (3 µM) and 1 µL of distilled water. Real time PCR cycling conditions were as follow: 3 min at 95 °C, followed by 40 cycles of amplification at 95 °C for 5 s, 60 °C for 20 s. Melting curves were plotted (55-95 °C) in order to ensure that a single PCR product was amplified for each set of primers. Negative controls (without DNA) were included to rule out DNA contamination.

Gene expression analysis

Real-time RT PCR was used to follow 39 viral genes [35] and five host genes. In both cases, the protocol was the same that previously described with 5 µL of cDNA dilution (1/30) instead of genomic DNA.

Viral gene expression

Viral RNA detection was performed only for family A2. Normalized relative viral gene expression levels were calculated for each individual by using the formula: $F = \log_{10}[(E+1)^{40-Ct}/N]$ adapted from de Decker et al. [36], where E is efficiency of each primer couple [35], Ct

(threshold cycle) corresponds to the PCR cycle number, N is the maximal number of viral DNA copies/ μ L of total DNA detected minus number of viral DNA copies/ μ L of total DNA determinate by absolute real time PCR for each individual and Ct = 40 is arbitrarily considered to correspond to “no Ct” obtained by real-time PCR.

Host gene expression

Expression of five oyster immune related genes was monitored only from family A2 by real-time PCR: myeloid differentiation factor 88 (MyD88), NF kappa-B inhibitor cactus (IKB2), interferon-induced protein 44 (IFI44), glypican (Gly) and Baculoviral apoptosis inhibitor repeat-containing protein 2 (IAP) genes [29]. The relative quantification value (ratio R) was calculated as described in Segarra et al. [29] using the method described by Pfaffl [37].

Host gene expression was normalized to that of elongation factor I (EF), as no significant differences of Ct values were observed for this housekeeping gene between several conditions during the course time (CV = 2.2%, Kruskal-Wallis test $Z = 0.10$, $p > 0.9$). The calibrator used for the experiment was individuals sampling at time 0.5 hpi for family A2.

Cytotoxicity and antiviral activity of haemolymph against HSV-1

Cytotoxicity and antiviral activity of oyster haemolymph were monitored in vitro on Vero cells as previously described [30,38]. HSV-1 titration was performed by the limiting dilution method [39]. The HSV-1 stock had a titer of $2.10^{7.4}$ ID₅₀/mL and MOI was 0.001 ID₅₀/cell. One hundred μ L of African green monkey kidney cell suspension (3.5×10^5 Vero ATCC CCL-81 cells/mL) diluted with MEM 8% FCS were distributed into the wells of a 96 wells plate. Cell suspensions were incubated with 50 μ L of oyster haemolymph and/or 50 μ L of HSV-1 cell suspension (48, 72, and 90 h, 37 °C, 5% CO₂) in Eagle's MEM containing 8% FCS. Triplicates of haemolymph suspension were tested. This model is currently used for the screening of antiviral molecules from marine organisms [40]. After 48, 72 and 96 h of incubation, antiviral activity was evaluated by the neutral red dye method [41]. After shaking, optical density (OD) was measured at 540 nm using a spectrophotometer (SpectraCount™; Packard). Cell and HSV-1 controls were run simultaneously. The antiherpetic compound acyclovir [9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine] (Merck), 25 mg/mL was used as a reference for HSV-1 inhibition.

The percentage of cytotoxicity was calculated as $[(OD)C - (OD)Oyster / (OD)C] \times 100$ where (OD)C and (OD)Oyster were the OD values of the control cells (without haemolymph or HSV-1) and treated cells with haemolymph, respectively [42]. The antiviral activity was calculated by: $[(OD)Oyster_{HSV-1} - (OD)_{HSV-1} / ((OD)Oyster - (OD)_{HSV-1})] \times 100$ where, (OD)Oyster_{HSV-1} was the OD of the test haemolymph with HSV-1, (OD)_{HSV-1} was OD of HSV-1 infected control cells, (OD)Oyster was the OD of the test haemolymph.

Data analysis

Kaplan-Meier survival curves and the Wilcoxon test were used to characterize and compare survival between adult oyster families A1 and A2, and spat.

CTs were calculated with the Stratagene Mxpro software 4.0. A heatmap was generated in order to represent the viral gene expression using the “heatmap” package in R. Clustering of viral genes was performed using the euclidean method. Results for relative expression of

oyster genes were expressed as mean $\pm$ standard error. A Mann-Whitney test was used to analyze oyster gene expression.

Correlations between viral DNA amounts and antiviral activity of haemolymph were tested with the Spearman's nonparametric rho using the XLSTAT software (version 2013), and results were declared statistically significant at the two-sided 5% (i.e., $P < 0.05$).

Results

Mortality and virus DNA detection for A1 and A2 families

The respective mean survival rates of families A1 and A2 were 70% and 75% at 144 hpi (Kaplan-Meier, Figure 1). The mean survival rates for oyster spat injected with the same viral suspension was 0% at 144 hpi (Figure 1). Mortality rates of infected adults (A1 and A2) were significantly different of controls and infected spat (Wilcoxon test, $p < 0.05$).

Although no mortality was observed in control adult oysters (oysters injected with sterile seawater), viral DNA was detected by real-time PCR in animals from both families (A1 and A2) (Figure 2). For control adults, the mean OsHV-1 DNA amounts were 1.5×10^1 viral DNA copies/ng of total DNA at 0.5 hpi from both families. Viral amounts increased and peaked at 10 hpi (1.0×10^2 viral DNA copies/ng of total DNA) and 26 hpi (9.1×10^2 viral DNA copies/ng of total DNA) in control adults from families A1 and A2, respectively (Figure 2) and decreased after these times. At later time points, the mean viral DNA amount observed was estimated at less than 10 viral DNA copies/ng of total DNA in A1 and A2 controls (Figure 2).

Concerning adults injected with the OsHV-1 suspension, viral DNA amounts increased to reach 7.1×10^4 viral DNA copies/ng of total DNA at 10 hpi and 8.9×10^5 viral DNA copies/ng of total DNA at 26 hpi in A2 and A1, respectively (Figure 2). At the end of the challenge, the viral DNA amounts were significantly different ($p < 0.005$) between both families. The viral amounts decreased during the challenge to reach < 10 and 8.8×10^3 viral DNA copies/ng of total DNA at 144 hpi in A2 and A1, respectively (Figure 2).

Dual transcriptomics of OsHV-1 and oyster genes in the family A2

Family A2 was selected in view of few viral DNA amounts detected at the end of the challenge. The expression levels of 39 OsHV-1 genes were studied by real-time PCR in mantle. The 39 selected genes were selected in previous studies based on the literature and/or their predicted functions [3,35]. The fold change of -7 (blue) consisted of no viral transcript detection, while -3 (yellow) consisted of highly expressed genes. No viral RNA was detected before the experimental infection (data not shown) and the first viral RNA was observed at 0.5, 10, 26 and 72 hpi (Figure 3).

Differences in terms of gene expression levels were observed between individuals collected at the same time. Although few transcripts were detected at 0.5 and 72 hpi, we observed clearly an up regulation of almost all virus genes in three individuals at 10 hpi (Fold change = -3) (Figure 3). About half of the viral genes were expressed at 26 hpi in all individuals. Finally, no transcripts were detected in all individuals at 144 hpi (Figure 3). Virus transcripts were grouped by the euclidean method to produce a dendrogram comparing the expression levels of

the 39 ORFs. Three clusters were observed: one group of highly expressed genes (C1), one group of moderately expressed genes (C2) and one group of low expressed genes (C3) (Figure 4). No significant difference was observed between C1 and C2 clusters. Nevertheless, genes included in C3 cluster were significant up-regulated compared to other genes (Mann-Whitney, $p < 0.05$) (Figure 4).

Concerning the five selected oyster genes, only three showed significantly different expressions between control adults and oysters injected with OsHV-1: IFI44 at 26, 72 and 144 hpi, Glypican at 144 hpi, and IAP at 10, 26, 72 and 144 hpi (Figure 5). Among these three genes, only IFI44 gene expression was down regulated at 26, 72 and 144 hpi in infected oysters compared to controls ($p < 0.05$). The two other genes were over-expressed. The IAP expression level decreased during the experimental infection but remained up regulated in infected oysters compared to controls (Figure 5).

Antiviral activity of haemolymph against HSV-1

Acyclovir (5 and 1 $\mu\text{g/mL}$) conferred high protection (95%) against HSV-1 with a low cell destruction (10%) (data not shown). For both families, antiviral activity of haemolymph with or without OsHV-1 stimuli was not significantly different at 48, 72 or 90 h incubation of Vero cells (Figures 6a and 6a). Moreover, the average of cytotoxicity activity ranged from 20 to 35% for both families (data not shown). The lowest cytotoxicity rate was observed for a cell incubation period of 48 h in family A2. Positive correlation between viral DNA amounts and antiviral activity was observed only for control and infected oysters with OsHV-1 in family A2 after 90 h of Vero cells incubation ($\rho = 0.7$, $p < 0.05$) (Figure 6b).

Discussion

Adult oysters do not demonstrate mortality in the field related to OsHV-1 detection. They were thus assumed to be more resistant than juveniles to viral infection [21,43]. However as Pacific oysters do not show macroscopic symptoms before dying during the course of OsHV-1 infection, it remains difficult in absence of mortality reports to know whether adults are susceptible to infection. Searching for viral DNA, RNA and proteins is one way to explore this question. Although Arzul et al. [21] demonstrated that viral DNA and proteins could be detected in apparently healthy adult oysters collected in the field, the development of the viral infection has never been studied in experimental conditions in the adult stage. An experimental protocol has been recently developed to reproduce the viral infection in oyster spat [19]. This protocol was used in the present study to explore what happened in adult oysters. Adults appear as a development stage of interest to inform (i) if the host is less susceptible at the adult stage than at younger stages, (ii) how adult oysters are able to manage the viral infection or (iii) what type of infection occurs in adults (i.e. acute versus persistent infection).

Recently, a study was performed to follow OsHV-1 gene expression in oyster spat [35]. Authors showed that viral transcripts were less expressed after 72 hpi in less susceptible oysters compared to highly susceptible ones [29]. Here, similar results were observed in adults after injection of a virus suspension with a prior increase of OsHV-1 DNA amounts and viral RNA expression followed by decreases at 72 hpi and 144 hpi. These results suggested that the virus was able to replicate in adult oysters. However, adult oysters demonstrated also a strong ability to control the viral infection in tested conditions. In the present study, we report a potentially reproducible experimental model of OsHV-1 infection in adult Pacific

oysters. This experimental model described shows that, during the acute phase of OsHV-1 infection, multiple viral genes were abundantly expressed resulting in large amounts of viral DNA and associated mortality in infected oysters. However after the acute phase, viral DNA was present but with undetectable viral gene expression. Moreover, the amounts of viral DNA detected were much lower than those detected in the acute phase and no mortality was recorded. These results suggests that OsHV-1 DNA could be maintained at low copy number during the phase following the acute phase of infection. This has previously been reported for persistent (and latent) infections in other herpesviruses [44].

Moreover, adult oysters used in the present study were positive for OsHV-1 DNA detection before the virus challenge. It consolidates the idea that adults may play the role of reservoirs for OsHV-1 as previously hypothesized [21,45].

Questions were thus opened about the status of the virus in adult oysters: (i) low level of virus replication related to an effective immunity or (ii) true latency involving the expression of a small number of viral genes.

Three hypothesis could be proposed to explain the lack of detection of viral transcripts in adults before the virus challenge and at 144 hpi. Firstly, the single tissue selected in the present study (mantle) to detect OsHV-1 RNAs may not be the best one to search for viral RNAs in case of chronic infection related to low virus replication or true latency. Although the mantle has been previously demonstrated as a site of high replication in naturally and experimentally infected spat [10,19,20], few data are available for adult oysters. Vertebrate herpesviruses are able to maintain more than one type of persistent infection at the same time and in different cell types. For example, chronic infection by Epstein-Barr virus (EBV) has been observed in pharyngeal epithelial cells whereas in the same individual it latently infected B lymphocytes [46,47] and herpes simplex virus (HSV) can undergo a lytic or latent infection in different cell types [48]. Therefore, in one individual, persistent infection with a single virus may involve multiple types of persistence.

Secondly, 39 viral genes were selected among the 124 from the virus genome and we could have missed those mainly involved in true latency. Finally, viral multiplication or latency could be related to levels of virus gene expression below the threshold of detection by real-time PCR. In HIV infection, antiviral treatment can reduce plasma and lymph node RNA levels below the level of detection of sensitive assays for nucleic acid [49].

Studies have demonstrated that the immune system of *C. gigas* spat is capable of recognizing of virus infection with resulting variations in expression of genes involved in virus recognition, signaling and immunity such as Myeloid Differentiation factor 88, IκB2, Interferon-induced protein 44, Glypican and apoptosis inhibitor [26-29]. In the current study, only three of the five selected oyster genes showed significant differences between experimentally infected oysters and control ones: IFI44, Glypican and IAP. Previous research has demonstrated that IFI44, a member of the IFN inducible gene family, was strongly up-regulated in hemolymph of infected juvenile oysters at 24 and 48 hpi [26], and in mantle of infected spat oysters at 4, 12, 26, 72 and 144 hpi [31]. Here, IFI44 was significantly down-regulated in adults after virus injection at 26, 72 and 144 hpi compared to control adults. Differences may be related to the operation of different defense mechanisms depending the development stage, spat versus adults. Moreover, Pacific oysters studied in the present study were identified as infected (viral DNA detection) before experimental infection and it is possible that the immune responses to OsHV-1 infection differ in primary infection and

reinfection. Results reported concerning MyD88 expression were in accordance with results previously reported in experimentally infected spat [29]. In vertebrates, this gene was described as an essential adaptor protein in the Toll/IL-1 receptor family signaling pathways [50]. Although MyD88 gene was demonstrated to be up-regulated during OsHV-1 infection before mortality occurred [26,51], Segarra et al. [29] showed no significant difference concerning MyD88 expression level between surviving spat after virus injection and controls oysters at 72 and 144 hpi. These results suggested that up-regulation of MyD88 gene is more a marker of infection than a marker of effective immunity.

Our data also showed that Glypican was up-regulated in infected oysters versus controls only at 144 hpi. Segarra et al. [29] previously reported that Glypican expression was also up-regulated in surviving oyster spat at 144 hpi compared to controls. Glypicans belong to a family of heparan sulfate proteoglycans that are linked to the cell surface by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. Glypicans play important roles in cellular growth, development [52], proteolysis and apoptosis [53,54].

In agreement with previous studies [29], our results also showed that IAP gene was up-regulated during viral infection compared to controls. Over-expression of IAP could be a reaction to the apoptotic process induced by OsHV-1 infection. The capacity of adult oysters to inhibit and control the apoptotic process could be essential for survival. Indeed, it has been proposed that high mortality rates affecting shrimp during viral infections could be related to a non-regulated apoptosis process [55].

Future research based on protein expression is now needed to confirm these results. Another experiment is currently in progress in the laboratory to analyse expression and tissue distribution of viral and host proteins using specific antibodies. In the current study, we measured antiviral activity of the haemolymph in adults after OsHV-1 injection in order to stimulate the antiviral response and the production of antiviral molecules. We can presume that adult oysters are able to maintain an effective immunity through antiviral activities. As no marine bivalve cell lines are available, studies have evaluated antiviral activity in aquatic invertebrates using heterologous cell lines including Vero cells [30,32,56-58]. Other studies [28,30,31,59,60] reported the presence of antiviral activities against different viruses in haemolymph of marine molluscs including the Pacific oyster, *C. gigas*, and showed higher anti-HSV-1 activity during summer [30,61]. Here, we have observed a positive correlation between viral DNA amounts and antiviral activity levels at 90 h of incubation from both conditions for family A2. Viral activities observed in control animals could be explained by OsHV-1 infection before challenge.

We can assume that the heterologous model needs to be improved in order to a suitable model for screening oysters for potential antiviral activities against OsHV-1. For the first time, mortality was reported in adults in experimental conditions. We showed that OsHV-1 was able to replicate at this stage of development. The decrease of viral transcript levels during the course of the assay suggested that adult oysters were able to manage the viral infection and control its replication.

Competing interests

This work was supported by Ifremer (Institut Français pour l'Exploitation de la Mer). The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

This study is the result of a collective work. AS, NB and TR conceived this study, and participated in its design. All others carried out several sampling. AS and TR drafted the manuscript. All authors read, corrected, and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Ifremer hatchery team (LGPM) in La Tremblade and the nursery team (LSPC) in Bouin for the production of Pacific oysters. This work was supported by the EU funded project Bivalife (PF7, n° 266157), the project MOLTRAQ (ERA NET EMIDA) and the Region Poitou-Charentes. Thanks to M.A Travers and B. Morga for their comments and suggestions on the manuscript.

Figures legends

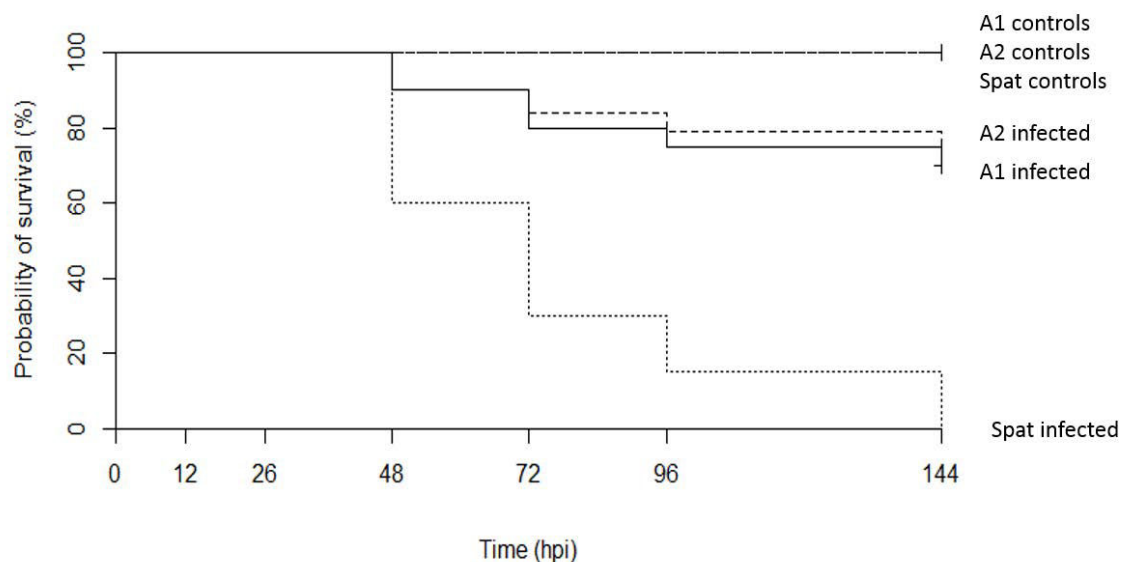


Figure 1 Survival of *Crassostrea gigas* adult oysters, A1 and A2 families, versus spat oysters during an experimental infection with OsHV-1. $n = 30$ oysters/condition. Controls were injected with artificial seawater.

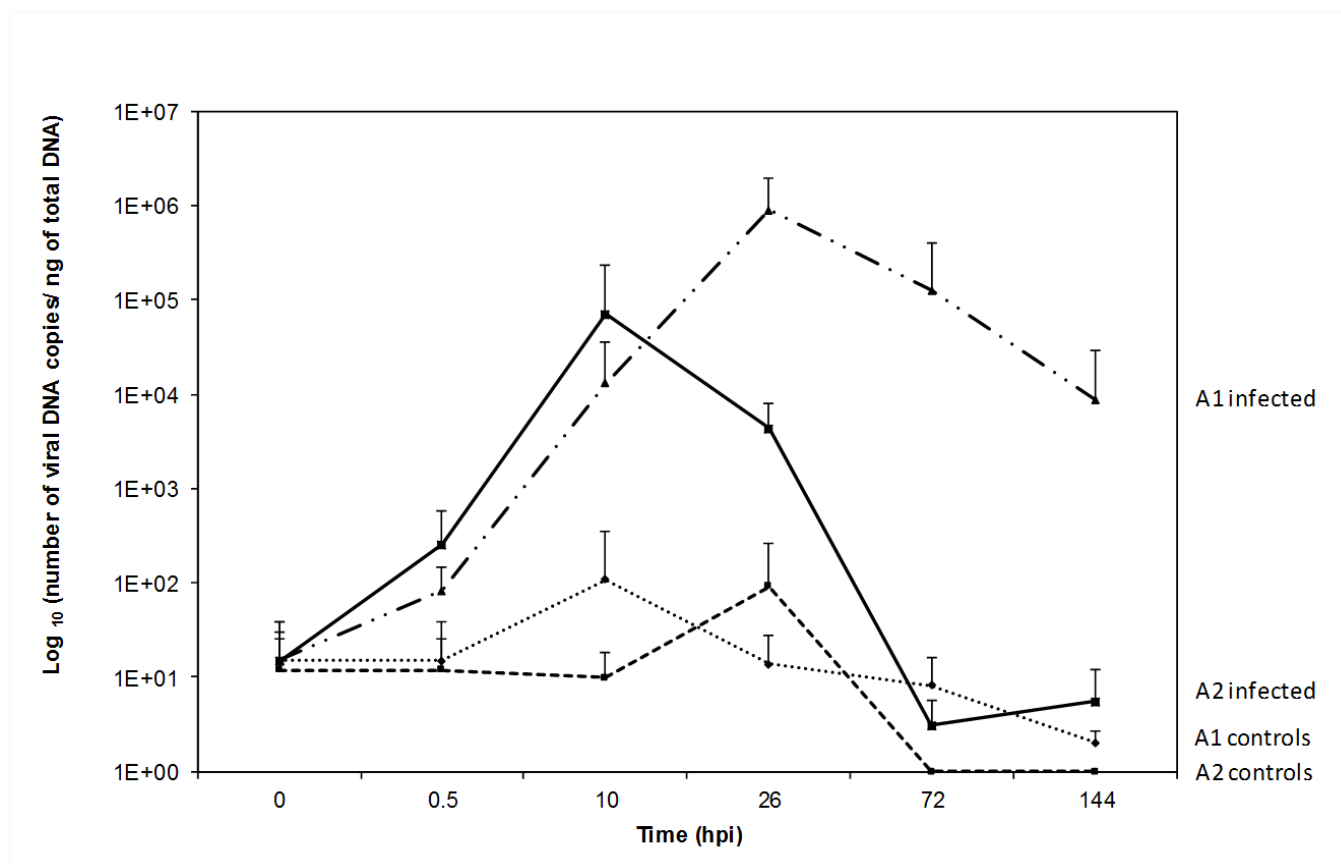


Figure 2 Virus DNA detection curves by real time quantitative PCR in adult oyster families A1 and A2. Average $n = 6$. Error bars represent $\pm$ standard deviation.

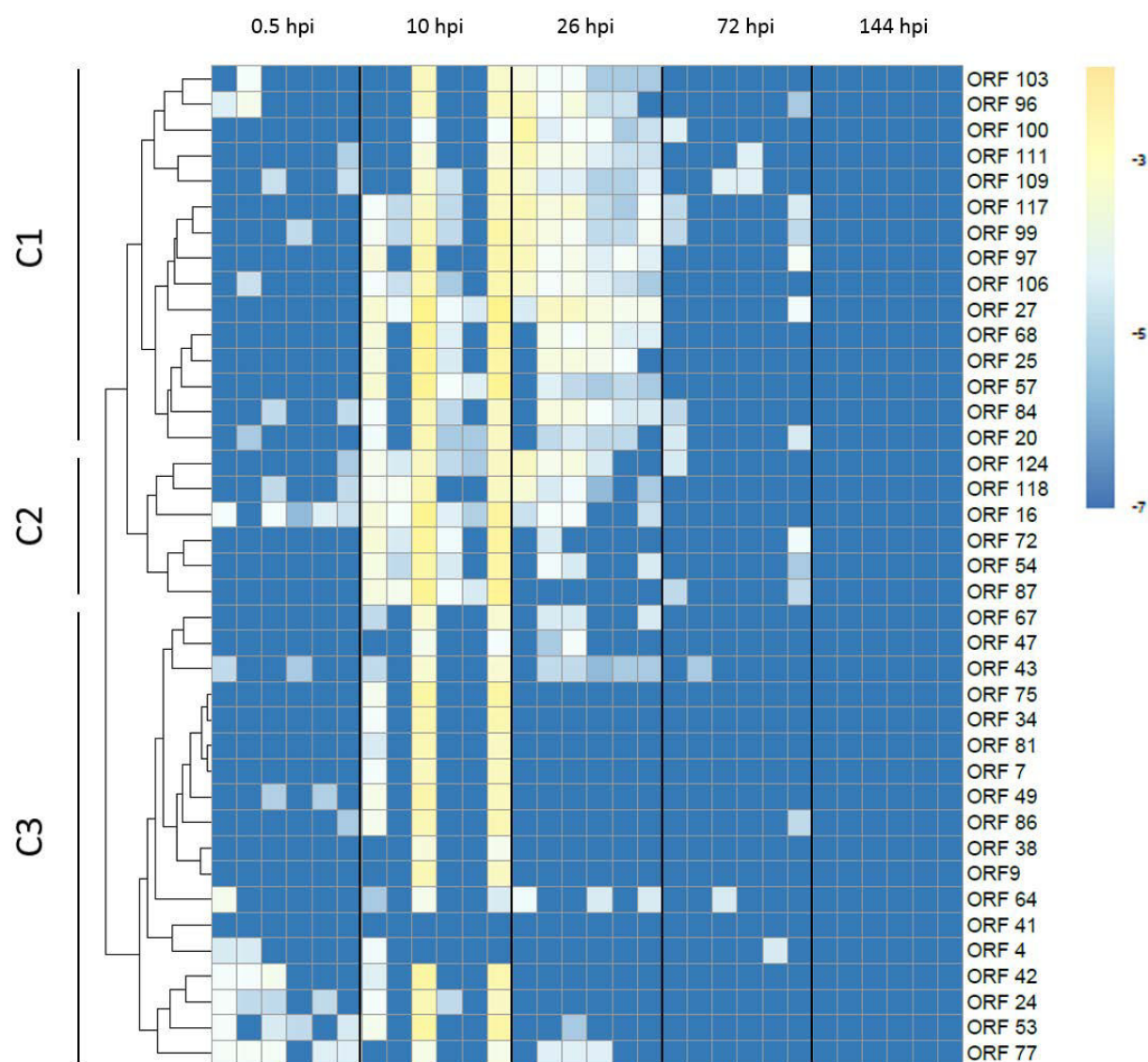


Figure 3 Heatmap illustrating the viral expression levels of 39 genes of OsHV-1 at different post infection time points in family A2. C1, C2 and C3 correspond at clusters of viral genes. Colors represent the fold change, blue and yellow denote low and high expression respectively. Rows are 39 viral genes and each column represents an individual ($n = 6$ per time). The full list of genes is available in Segarra et al. (Segarra et al., 2014b).

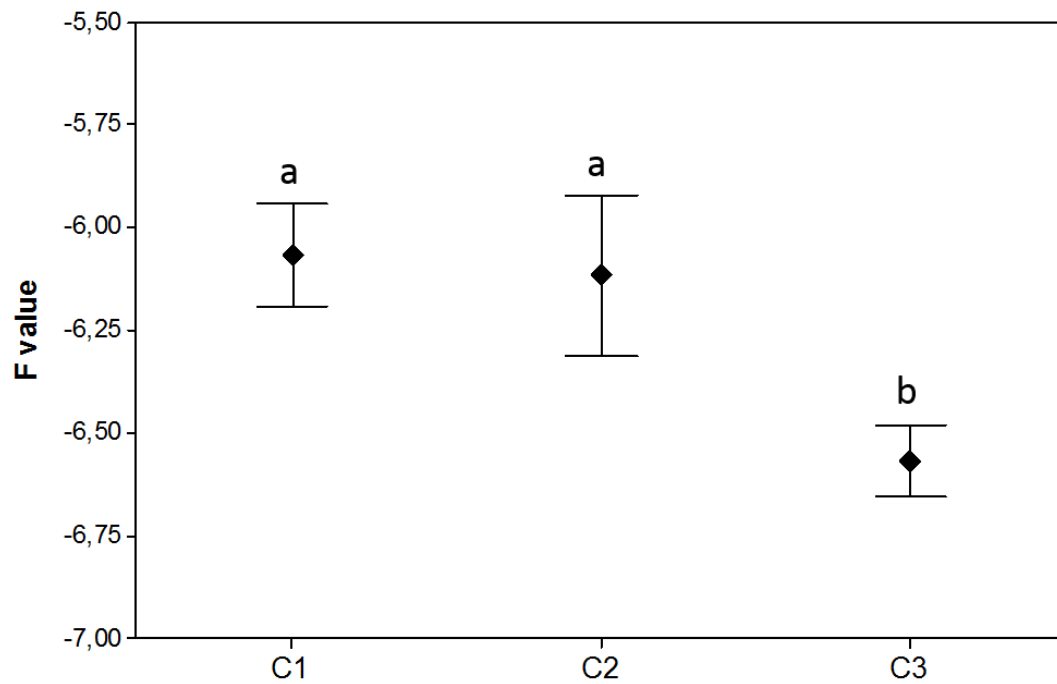


Figure 4 Means of viral gene expression for each cluster. Different lowercase letters indicate significant differences (Mann-Whitney test, $p < 0.05$) between clusters. Error bars represent $\pm$ standard deviation.

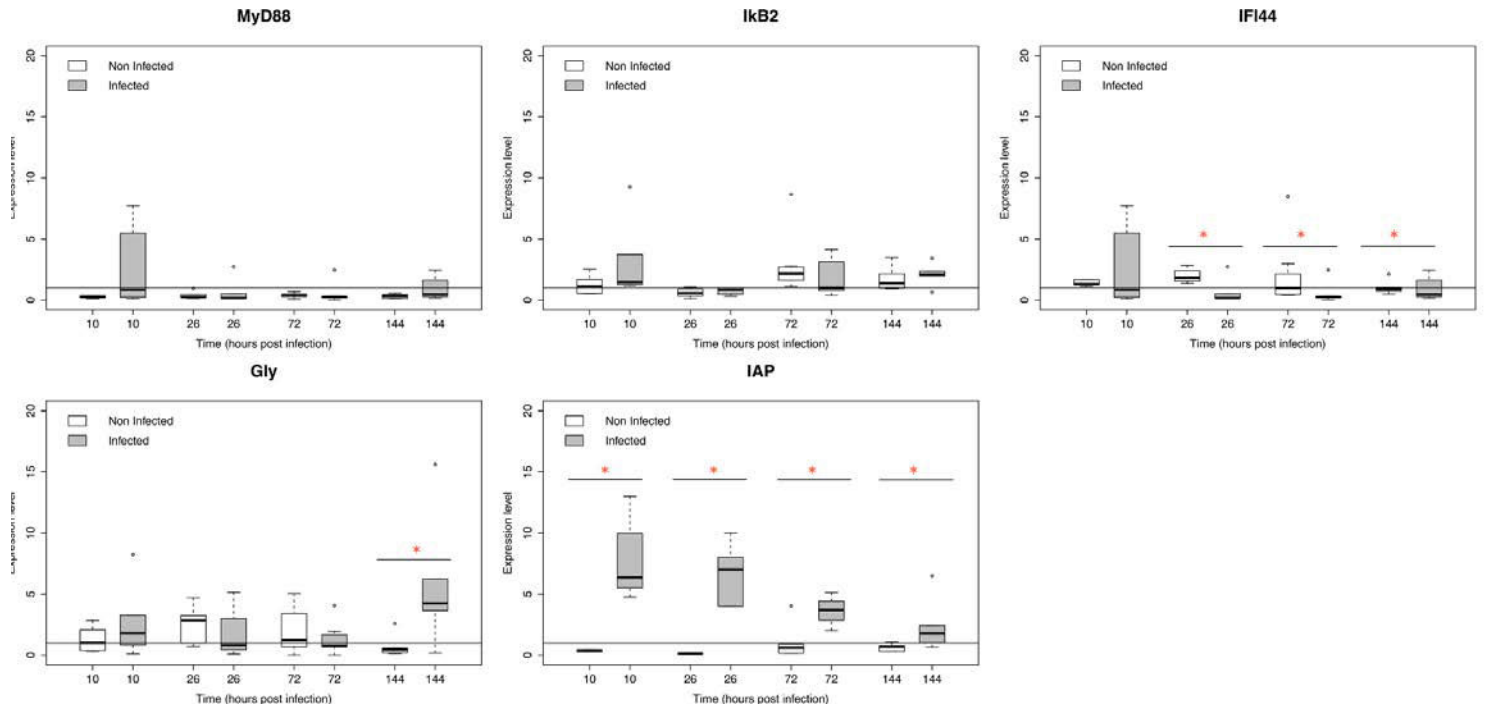


Figure 5 Relative expression for family A2 by real time PCR of five selected oyster genes (MyD88: myeloid differentiation factor 88, Ikb2: Inhibitor of nuclear factor kappaB kinase beta, IFI44: Interferon induced protein 44, Gly: Glypican and IAP: Inhibitor of apoptosis) at 10, 26, 72 and 144 hpi. White boxplots: non-infected oysters; grey boxplots: infected oysters. Expression levels were normalized to EF (mean $\pm$ SD, $n = 6$). Controls are arbitrarily assigned to a value of 1. * Significant difference of gene expression compared to controls by Mann-Whitney test.

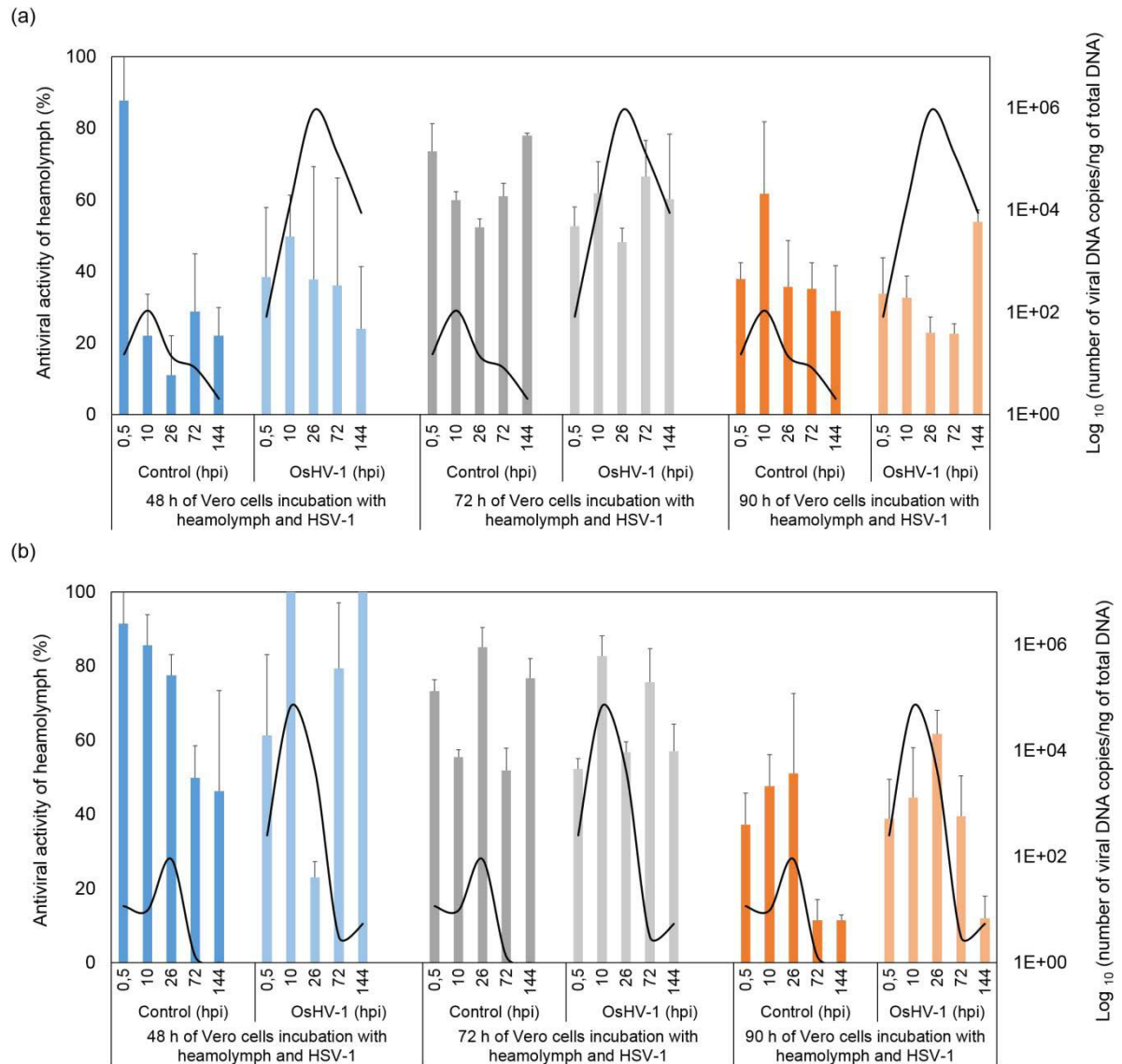


Figure 6 Antiviral activity kinetic of adult oyster haemolymph stimulated or no stimulated with OsHV-1 for family A1 (a) and family A2 (b) at different times in relation to HSV-1 infection of Vero cells. Blue bars, 48 h of Vero cells incubation with haemolymph and HSV-1 virus; Grey bars, 72 h of Vero cells incubation with haemolymph and HSV-1 virus and orange bars, 90 h of Vero cells incubation with haemolymph and HSV-1 virus. The viral DNA quantification is presented by black curves.

References

1. Farley CA, Banfield WG, Kasnic G, Foster WS: Oyster herpes-type virus. *Science* 1972, 178:759–760.
2. Le Deuff RM, Renault T: Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *J Gen Virol* 1999, 80:1317–1322.
3. Davison AJ, Trus BL, Cheng N, Steven AC, Watson MS, Cunningham C, Le Deuff RM, Renault T: A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J Gen Virol* 2005, 86:41–53.
4. Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E: The order Herpesvirales. *Arch Virol* 2009, 154:171–177.
5. Renault T, Le Deuff RM, Cochenne N, Chollet B, Maffart P: Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: a comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Vet Res* 1995, 26:539–543.
6. Burge CA, Griffin FJ, Friedman CS: Mortality and herpesvirus infections of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Tomales Bay, California, USA. *Dis Aquat Organ* 2006, 72:31–43.
7. Sauvage C, Pépin JF, Lapègue S, Boudry P, Renault T: Ostreid herpes virus 1 infection in families of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during a summer mortality outbreak: differences in viral DNA detection and quantification using real-time PCR. *Virus Res* 2009, 142:181–187.
8. Garcia C, Thébault A, Dégremont L, Arzul I, Miossec L, Robert M, Chollet B, François C, Joly J-P, Ferrand S, Kerdudou N, Renault T: Ostreid herpesvirus 1 detection and relationship with *Crassostrea gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. *Vet Res* 2011, 42:73.
9. Le Deuff RM, Renault T, Cochenne N: Antibodies specific for channel catfish virus cross-react with Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, herpes-like virus. *Vet Res* 1995, 26:526–529.
10. Lipart C, Renault T: Herpes-like virus detection in infected *Crassostrea gigas* spat using DIG-labelled probes. *J Virol Methods* 2002, 101:1–10.
11. Pepin JF, Riou A, Renault T: Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *J Virol Methods* 2008, 149:269–276.
12. Abend JR, Ramalingam D, Kieffer-Kwon P, Uldrick TS, Yarchoan R, Ziegelbauer JM: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNAs target IRAK1 and MYD88, two components of the toll-like receptor/interleukin-1R signaling cascade, to reduce inflammatory-cytokine expression. *J Virol* 2012, 86:11663–11674.
13. Scientific Opinion on the increased mortality events in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *EFSA J* 2010, 8:1894.

14. Renault T: Pacific Cupped Oyster, *Crassostrea gigas*, Mortality outbreaks and infectious diseases. In *Oysters Physiol Ecol Distrib Mortal*. Nova Science Publishers Inc. Jian G. Qin; 2012:203–225. [Chapter 8].
15. Jenkins C, Hick P, Gabor M, Spiers Z, Fell SA, Gu X, Read A, Go J, Dove M, O'Connor W, Kirkland PD, Frances J: Identification and characterisation of an ostreid herpesvirus-1 microvariant (OsHV-1 μ -var) in *Crassostrea gigas* (Pacific oysters) in Australia. *Dis Aquat Organ* 2013, 105:109–126.
16. Segarra A, Pépin JF, Arzul I, Morga B, Faury N, Renault T: Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res* 2010, 153:92–99.
17. Martenot C, Oden E, Travaillé E, Malas J-P, Houssin M: Detection of different variants of Ostreid Herpesvirus 1 in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* between 2008 and 2010. *Virus Res* 2011, 160:25–31.
18. Renault T, Moreau P, Faury N, Pepin J-F, Segarra A, Webb S: Analysis of clinical ostreid herpesvirus 1 (Malacoherpesviridae) specimens by sequencing amplified fragments from three virus genome areas. *J Virol* 2012, 86:5942–5947.
19. Schikorski D, Renault T, Saulnier D, Faury N, Moreau P, Pépin J-F: Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. *Vet Res* 2011, 42:27.
20. Schikorski D, Faury N, Pepin JF, Saulnier D, Tourbiez D, Renault T: Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Res* 2011, 155:28–34.
21. Arzul I, Renault T, Thébault A, Gérard A: Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Res* 2002, 84:151–160.
22. Barbosa-Solomieu V, Miossec L, Vázquez-Juárez R, Ascencio-Valle F, Renault T: Diagnosis of Ostreid herpesvirus 1 in fixed paraffin-embedded archival samples using PCR and in situ hybridisation. *J Virol Methods* 2004, 119:65–72.
23. Wise JA, Harrell SF, Busch RL, Boyle JA: Vertical transmission of channel catfish virus. *Am J Vet Res* 1988, 49:1506–1509.
24. Kimura T, Yoshimizu M, Tanaka M, Sannohe H: Studies on a new virus (OMV) from *Oncorhynchus masou*. I. Characteristics and pathogenicity. *Fish Pathol* 1981, 15:143–147.
25. Honess RW, Roizman B: Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins 1. *J Virol* 1974, 14:8–19.
26. Renault T, Faury N, Barbosa-Solomieu V, Moreau K: Suppression subtractive hybridisation (SSH) and real time PCR reveal differential gene expression in the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, challenged with Ostreid herpesvirus 1. *Dev Comp Immunol* 2011, 35:725–735.

27. Green TJ, Montagnani C: Poly I:C induces a protective antiviral immune response in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against subsequent challenge with Ostreid herpesvirus (OsHV-1 μ var). *Fish Shellfish Immunol* 2013, 35:382–388.
28. Green TJ, Montagnani C, Benkendorff K, Robinson N, Speck P: Ontogeny and water temperature influences the antiviral response of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol* 2014, 36:151–157.
29. Segarra A, Mauduit F, Faury N, Trancart S, Dégremont L, Tourbiez D, Haffner P, Barbosa-Solomieu V, Pépin J-F, Travers M-A, Renault T: Dual transcriptomics of virus-host interactions: comparing two Pacific oyster families presenting contrasted susceptibility to ostreid herpesvirus 1. *BMC Genomics* 2014, 15:580.
30. Olicard C, Didier Y, Marty C, Bourgougnon N, Renault T: In vitro research of anti-HSV-1 activity in different extracts from Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Dis Aquat Organ* 2005, 67:141–147.
31. Olicard C, Renault T, Torhy C, Benmansour A, Bourgougnon N: Putative antiviral activity in hemolymph from adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Antiviral Res* 2005, 66:147–152.
32. Dang VT, Benkendorff K, Speck P: In vitro antiviral activity against herpes simplex virus in the abalone *Haliotis laevigata*. *J Gen Virol* 2011, 92:627–637.
33. Degremont L, Benabdelmouna A: Mortality associated with OsHV-1 in spat *Crassostrea gigas*: role of wild-caught spat in the horizontal transmission of the disease. *Aquac Int* 2014:1–15.
34. Namba K, Kobayashi M, Aida S, Uematsu K, Yoshida M, Kondo Y, Miyata Y: Persistent relaxation of the adductor muscle of oyster *Crassostrea gigas* induced by magnesium ion. *Fish Sci* 1995, 61:241–244.
35. Segarra A, Faury N, Pépin J-F, Renault T: Transcriptomic study of 39 ostreid herpesvirus 1 genes during an experimental infection. *J Invertebr Pathol* 2014, 119:5–11.
36. De Decker S, Reynaud Y, Saulnier D: First molecular evidence of cross-species induction of metalloprotease gene expression in *Vibrio* strains pathogenic for Pacific oyster *Crassostrea gigas* involving a quorum sensing system. *Aquaculture* 2013, 392:1–7.
37. Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res* 2001, 29:e45.
38. Defer D, Bourgougnon N, Fleury Y: Screening for antibacterial and antiviral activities in three bivalve and two gastropod marine molluscs. *Aquaculture* 2009, 293:1–7.
39. Reed LJ, Muench H: A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol* 1938, 27:493–497.

40. Yasin B, Pang M, Turner JS, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ, Lehrer RI, Wagar EA: Evaluation of the inactivation of infectious Herpes simplex virus by host-defense peptides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000, 19:187–194.
41. McLaren C, Ellis MN, Hunter GA: A colorimetric assay for the measurement of the sensitivity of herpes simplex viruses to antiviral agents. *Antiviral Res* 1983, 3:223–234.
42. Takeuchi H, Baba M, Shigeta S: An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. *J Virol Methods* 1991, 33:61–71.
43. Renault T: Maîtriser les maladies infectieuses pour une aquaculture durable: les maladies infectieuses chez les mollusques, un risque à maîtriser pour une aquaculture durable. Éditions universitaires européennes, 2010.
44. Sawtell NM: Comprehensive quantification of herpes simplex virus latency at the single-cell level. *J Virol* 1997, 71:5423–5431.
45. Le Deuff RM, Renault T, Gerard A: Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis Aquat Organ* 1996, 24:149–157.
46. Thompson MP, Kurzrock R: Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res* 2004, 10:803–821.
47. Middeldorp JM, Brink AATP, Brule VD, J.c A, Meijer CJLM: Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003, 45:1–36.
48. Knipe DM, Cliffe A: Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nat Rev Microbiol* 2008, 6:211–221.
49. Cavert W, Notermans DW, Staskus K, Wietgreffe SW, Zupancic M, Gebhard K, Henry K, Zhang Z-Q, Mills R, McDade H, Goudsmit J, Danner SA, Haase AT: Kinetics of response in lymphoid tissues to antiretroviral therapy of HIV-1 infection. *Science* 1997, 276:960–964.
50. Warner N, Núñez G: MyD88: a critical adaptor protein in innate immunity signal transduction. *J Immunol* 2013, 190:3–4.
51. Du Y, Zhang L, Huang B, Guan X, Li L, Zhang G: Molecular cloning, characterization, and expression of two myeloid differentiation Factor 88 (Myd88) in Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *J World Aquac Soc* 2013, 44:759–774.
52. Litwack ED, Ivins JK, Kumbasar A, Paine-Saunders S, Stipp CS, Lander AD: Expression of the heparan sulfate proteoglycan glypican-1 in the developing rodent. *Dev Dyn* 1998, 211:72–87.
53. Gonzalez AD, Kaya M, Shi W, Song H, Testa JR, Penn LZ, Filmus J: OCI-5/GPC3, a glypican encoded by a gene that is mutated in the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, induces apoptosis in a cell line-specific manner. *J Cell Biol* 1998, 141:1407–1414.

54. Cano-Gauci DF, Song HH, Yang H, McKerlie C, Choo B, Shi W, Pullano R, Piscione TD, Grisaru S, Soon S, Sedlackova L, Tanswell AK, Mak TW, Yeger H, Lockwood GA, Rosenblum ND, Filmus J: Glypican-3-deficient mice exhibit developmental overgrowth and some of the abnormalities typical of Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *J Cell Biol* 1999, 146:255–264.
55. Khanobdee K, Soowannayan C, Flegel T, Ubol S, Withyachumnarnkul B: Evidence for apoptosis correlated with mortality in the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with yellow head virus. *Dis Aquat Organ* 2002, 48:79–90.
56. Li MF, Traxler GS: Antiviral activity of aqueous clam (*Mya arenaria*) extract on amphibian virus (LT-1). *Can J Microbiol* 1972, 18:397–402.
57. Lee T-G, Maruyama S: Isolation of HIV-1 protease-inhibiting peptides from thermolysin hydrolysate of oyster proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 253:604–608.
58. Renault T, Le Deuff RM, Cochenne N, Maffart P: Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France-Comparative study. *Rev Med Vet* 1994, 145:735–742.
59. Carriel-Gomes MC, Kratz JM, Müller VDM, Barardi CRM, Simões CMO: Evaluation of antiviral activity in hemolymph from oysters *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas*. *Aquat Living Resour* 2006, 19:189–193.
60. Zeng M, Cui W, Zhao Y, Liu Z, Dong S, Guo Y: Antiviral active peptide from oyster. *Chin J Oceanol Limnol* 2008, 26:307–312.
61. Dang VT, Speck P, Benkendorff K: Influence of elevated temperatures on the immune response of abalone, *Haliotis rubra*. *Fish Shellfish Immunol* 2012, 32:732–740.

II. Conclusion du chapitre 4

Ce chapitre a été consacré à l'étude de l'infection virale au stade adulte chez l'huître creuse et visait à répondre à la question suivante :

Q7. L'huître creuse, est-elle résistante à l'infection au stade adulte ?

Non, ce chapitre démontre que les adultes peuvent présenter des mortalités suite à une infection en condition expérimentale. Néanmoins, ce taux reste relativement faible (environ 10%), ce résultat est également retrouvé chez du naissan d'huître décrit comme peu sensible à l'infection par OsHV-1. Jusqu'à présent, l'ensemble de la littérature s'accordait pour décrire les huîtres creuses adultes comme non touchées par les épisodes de mortalité causés par OsHV-1 en milieu naturel. De plus, l'augmentation de la quantité d'ADN et d'ARN viraux prouve que le virus peut se répliquer chez les huîtres au stade adulte. Seul un ORF sur les 39 recherchés n'a pas été détecté durant cette expérience, l'ORF 41 codant pour une protéine inconnue. Cette observation pourrait être due à une limite de détection de la PCR en temps réel. Néanmoins, l'implication de ce gène dans la multiplication virale d'OsHV-1 ou la virulence reste à élucider. Il est important aussi de rappeler que l'infection virale a pu être induite par injection de matériel infectieux et que cette voie reste éloignée des conditions naturelles d'infection.

A la fin de l'expérience, les ARN viraux ne sont plus détectés chez les huîtres survivantes. Les hypothèses de la persistance du virus ou d'une rémission/guérison peuvent être envisagées. Il est important de rappeler qu'une très faible quantité d'ADN viral a été observée avant l'infection, chez les individus alors qu'aucun transcrit n'était détecté. La notion de « priming » prend ici toute son importance. La détection du virus avant l'injection de la suspension virale et les mortalités limitées observées après cette injection suggèrent la possibilité d'une protection contre la réinfection par OsHV-1 et l'existence potentielle d'un phénomène de priming chez *C. gigas*. La présence du virus pourrait aussi être à l'origine d'une stimulation constante du système immunitaire permettant ainsi aux animaux porteurs de mieux se défendre vis-à-vis d'une ré-infection. De plus, l'étude de l'expression des gènes

cellulaires révèle une forte expression du gène IAP (inhibiteur de l'apoptose) chez *C. gigas* dès 10 hpi. Ceci laisse penser une augmentation de l'apoptose dans les premiers stades de l'infection par OsHV-1, permettant ainsi à l'huître de se défendre contre ce virus. Cependant, un phénomène d'apoptose non régulé pourrait être en partie à l'origine des mortalités observées chez les huîtres. Cela a pu être rapporté chez les crevettes pénéides infectées par des virus (Khanobdee *et al.*, 2002). Une capacité accrue à limiter ce phénomène pourrait permettre aux animaux de réduire le nombre de cellules apoptotiques.

Concernant les activités antivirales, une stimulation suite à une injection d'une suspension virale ne semble pas induire une augmentation des activités anti-HSV-1. La question peut donc se poser de savoir si le suivi de ces activités antivirales (anti-HSV-1) informe sur les capacités de défense vis-à-vis du virus OsHV-1. Cependant, très récemment, il a été rapporté qu'une glycoprotéine de l'hémolymph de *C. gigas*, la cavortine pourrait inhiber la réplication d'HSV-1 en contact avec des cellules vero (Green *et al.*, 2014). Cette protéine avait déjà été identifiée comme une protéine majeure de l'hémolymph chez l'huître creuse (Scotti *et al.*, 2007)

L'utilisation d'un modèle homologue serait plus adaptée. Cependant, aucune lignée cellulaire de mollusques marins n'est actuellement disponible, rendant les études *in vitro* difficiles. D'autres études *in vivo* pourraient néanmoins être envisagées afin d'étudier les activités antivirales chez l'huître adulte. De l'hémolymph de huîtres adultes pourraient être ponctionné à différents temps post infection, mélangé à une suspension virale et finalement injecté à d'autres huîtres saines. En l'absence de mortalités, une activité antivirale pourrait alors être montrée.

La réalisation de ces travaux ouvre de nouvelles perspectives quant à la sensibilité virale chez l'huître creuse adulte, mais également sur la notion de surinfection virale. Des travaux pourraient être envisagés dans le but de documenter la capacité de l'huître adulte à éliminer le virus ou si ce dernier entre en persistance. Comme suggéré dans le chapitre 2, le virus pourrait être réactivé par un choc thermique ou stress prouvant ainsi sa persistance au sein de l'hôte

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES



I. Détection et localisation d'ARNm d'OsHV-1 chez *C. gigas*

L'expression séquentielle des gènes viraux (très précoces α , précoces β et tardifs γ) est classique et bien documentée chez les herpèsvirus infectant les vertébrés (Honess et Roizman, 1974). Il semblait donc pertinent d'appréhender la notion d'expression séquentielle des gènes d'OsHV-1 couramment décrite chez les autres herpèsvirus. Comme précisé dans l'état de l'art, le génome complet d'OsHV-1 est disponible depuis 2005 (AY509253.2). Or, environ 65% des protéines virales codées par ce génome ne présentent aucune homologie dans les banques de données. Un travail d'alignement de séquences codantes d'OsHV-1 (non décrit dans ce manuscrit) a été entrepris dans le but de déterminer si de nouveaux domaines ou de nouvelles fonctions étaient identifiables depuis le premier travail d'annotation du génome. Aucun nouveau domaine ou nouvelle fonction n'ont été identifiés parmi les 124 régions codantes du virus. Nous avons donc décidé de sélectionner un certain nombre de gènes (39 gènes) dont la fonction ou un motif protéique présentait des homologies avec des protéines connues. A la vue du grand nombre d'échantillons à analyser, la PCR en temps réel a été l'approche choisie. Le premier objectif étant d'étudier *in vitro* et *in vivo* la cinétique d'expression de gènes viraux, le choix de travailler en individuel s'est imposé à nous.

Notre étude montre pour la première fois, qu'il était possible de suivre *in vivo* l'expression de 39 gènes viraux au cours d'une d'infection expérimentale au sein de l'huître creuse, *C. gigas*. Certains transcrits viraux ont ainsi été détecté *in vivo* dès 2 à 4 hpi chez quelques individus. L'une des hypothèses envisagées est que cette expression (précoce) ne soit pas suffisante pour être détectable dans tous les individus analysés. Au contraire, lorsque l'expression des gènes viraux atteint un certain niveau, la multiplication virale est telle que plusieurs cycles viraux se chevauchant, rendent difficile la classification des gènes. Malgré l'injection d'une suspension virale permettant d'administrer la même quantité d'agents infectieux de manière simultanée, une variabilité interindividuelle a été observée en termes de cinétique de détection d'ADN et d'ARN viraux. Cette variabilité entre individus peut en partie être expliquée par un processus différent de propagation du virus de cellule à cellule : en d'autres termes, l'infection virale peut ne pas être synchrone entre les différentes huîtres expérimentalement infectées. De plus, dans un même prélèvement, il est très certainement possible d'avoir des cellules infectées à

différents temps du cycle viral et il reste de ce fait difficile de pouvoir définir une cinétique d'expression pour un gène viral donné.

Afin de disposer d'un système pouvant permettre d'observer une infection synchrone dans différentes cellules, nous avons tenté d'infecter des primo-cultures de cellules cardiaques. En effet, le moyen couramment utilisé pour étudier la cinétique d'expression de gènes viraux reste la culture cellulaire. Dans notre étude, les travaux *in vitro* suggèrent également une réplication virale à bas bruit dans les cellules cardiaques, mais les résultats obtenus demandent à être répétés et validés. Le suivi de l'expression des gènes par une approche *in vitro* serait plus simple et pourrait être confirmé par l'utilisation d'anticorps ciblant des protéines d'intérêt au cours du temps.

De plus, nos travaux mettent en évidence la présence d'ARN viraux dans différents tissus sur la base d'une approche d'hybridation *in situ*. Ceci prouve que le virus est capable de se multiplier dans différents tissus de l'huître. Néanmoins, le manteau et les branchies ont montré une plus grande détection de transcrits viraux. Ces tissus semblent être des cibles du virus et ces résultats confirment ceux obtenus par microscopie électronique à transmission (Schikorski *et al.*, 2011b) et recherche d'ADN par hybridation *in situ*. En outre, le cœur apparaît également comme étant un organe cible du virus. Nous suggérons ainsi que ce muscle pourrait être à l'origine de la dissémination du virus dans les autres tissus notamment par le biais de l'hémolymph.

II. Interactions entre OsHV-1 et l'huître creuse, à différents stades et présentant différentes sensibilités à l'infection virale

L'identification et la caractérisation de différences transcriptomiques de gènes viraux et cellulaires chez des individus présentant des sensibilités contrastées à l'infection à OsHV-1, nous a permis de mettre en évidence :

- ✓ une réplication plus précoce chez les individus appartenant à la famille sensible (à l'infection) en comparaison aux animaux appartenant à la famille la moins sensible ;
- ✓ un niveau d'expression des gènes viraux plus élevé chez les huîtres sensibles comparé aux moins sensibles;
- ✓ un niveau d'expression de certains gènes cellulaires plus élevé également chez les animaux les plus sensibles;
- ✓ que les deux familles testées excrétaient le virus, mais de façon plus importante chez les individus appartenant à la famille la plus sensible ;
- ✓ des réponses physiologiques contrastées : (i) mort de l'ensemble des individus appartenant à la famille la plus sensible et (ii) mortalité réduite pour les individus appartenant à la famille la moins sensible, avec absence de détection d'ADN et d'ARN viraux chez les animaux survivants en fin d'expérience ;
- ✓ une excrétion d'ADN viral chez les deux familles, mais également chez des animaux survivant à l'infection ;

L'étude de la modulation de la sensibilité des huîtres et la caractérisation de différences transcriptomiques de gènes viraux et cellulaires nous a permis de montrer :

- ✓ que l'ARN interférence permettait de moduler la sensibilité des huîtres creuses à l'infection virale de manière non spécifique ;
- ✓ que le niveau de réplication était plus important chez les individus « non-traités » (sans ARNdb) ;
- ✓ un niveau d'expression de certains gènes cellulaires sélectionnés plus élevé chez les animaux « non-traités » par rapport aux individus « traités ».

Enfin, en cherchant à identifier des activités antivirales et étudier le transcriptome d'OsHV-1 au cours d'une infection au stade adulte chez l'huître creuse, nous avons pu mettre en évidence :

- ✓ que les huîtres creuses adultes étaient moins sensibles que le naissain ;
- ✓ une réplication virale faible chez les huîtres adultes ;
- ✓ l'absence de détection d'ADN et d'ARN viraux en fin d'expérience;
- ✓ l'expression du gène IFI44 plus importante chez les animaux contrôles ;
- ✓ l'expression du gène IAP plus importante chez les huîtres infectées que chez les individus contrôles.

Néanmoins, aucune augmentation d'activité antivirale vis-à-vis du virus HSV-1 n'a pu être montrée chez les huîtres adultes expérimentalement infectées en comparaison aux animaux contrôles au cours de cette étude.

Ainsi, différentes hypothèses peuvent être émises :

II.1 Une réplication virale coûte que coûte ?

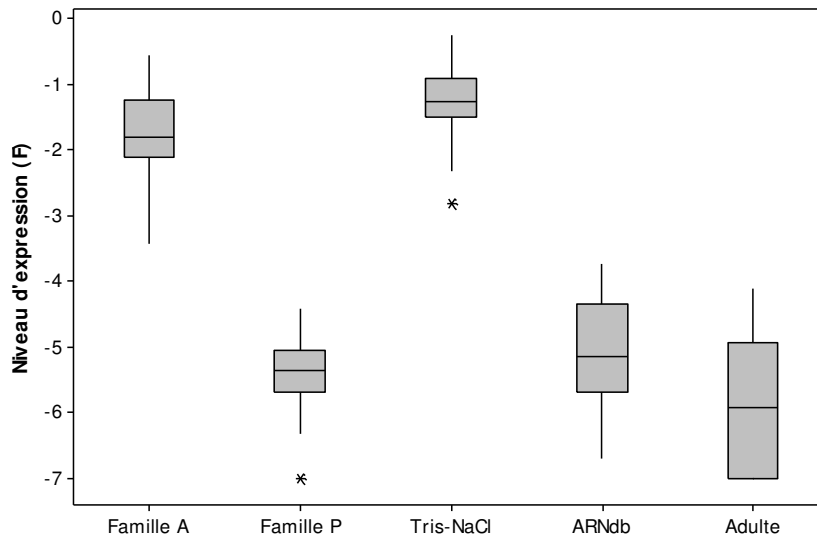


Figure 31: Bilan du niveau d'expression des gènes viraux en fonction du matériel biologique

Tout d'abord, les résultats obtenus suggèrent que la réplication virale peut avoir lieu quelque soit la sensibilité, le stade de développement et dans différents tissus de l'hôte. Néanmoins, des différences dans les niveaux d'expression de gènes viraux au cours d'une infection virale chez *C. gigas* sont observées en fonction de l'origine génétique. Le niveau d'expression est nettement supérieur chez les animaux issus d'une famille très sensible à l'infection virale comparé à celui observé pour une famille peu sensible (**Figure 31**, p227). Une analyse globale des différents matériels biologiques reste périlleuse sur la base du niveau d'expression.

Néanmoins, le point fort de cette thèse réside dans l'utilisation de matériel biologique contrasté. Ainsi, il était primordial de pouvoir comparer l'ensemble du jeu de données et de discuter les résultats obtenus de manière intégrée. Dans cette optique et pour chaque expérience, nous avons volontairement choisi d'utiliser le nombre d'individu (%) positif pour chaque ORF viral à un temps donné. Ce temps correspond au moment où la quantité d'ADN virale est la plus élevée et a donc été sélectionné en fonction du matériel biologique (par

exemple 26 hpi pour la famille A et 72 hpi pour la famille P). L'ensemble de ces données est résumé dans le **Tableau IV**, p228.

Tableau IV: Bilan des individus détectés positifs pour les 39 ORFs viraux en fonction du matériel biologique (%). Pour chaque matériel biologique, le pourcentage a été obtenu à partir du temps (hpi) pour lequel la quantité d'ADN viral était la plus élevée.

Matériel biologique		Article 1	Famille A	Tris-NaCl	Famille P	dsRNA	A2
Stade		Naissain	Naissain	Naissain	Naissain	Naissain	Adulte
Tissu		Manteau	Manteau	Branchie	Manteau	Branchie	Manteau
Survie (%)		0	0	0	90	92	80
ADN viral (quantité)		1,E+05	1,E+06	1,E+05	1,E+03	1,E+04	1,E+05
Protéines inconnues	ORF 4	89	92	100	33	63	17
	ORF 43	100	92	100	50	100	33
	ORF 47	89	92	100	33	38	50
	ORF 57	89	92	100	50	88	83
	ORF 81	89	92	100	25	88	50
	ORF 86	89	92	100	33	75	50
	ORF 64	100	92	100	33	88	50
Enzymes	ORF 7	89	92	100	50	50	50
	ORF 20	89	92	100	42	88	83
	ORF24	89	92	100	25	75	67
	ORF 27	100	92	100	67	88	50
	ORF 34	89	92	100	33	25	50
	ORF 49	89	92	88	67	100	50
	ORF 67	89	92	100	42	50	50
	ORF 75	89	92	100	33	75	50
	ORF 100	89	92	100	25	50	33
	ORF 109	89	92	100	42	88	50
Protéines Ring finger	ORF 9	89	92	100	42	50	33
	ORF 38	89	92	100	17	25	33
	ORF 53	89	92	100	42	100	50
	ORF 96	89	92	100	33	50	33
	ORF 97	89	92	100	33	50	50
	ORF 117	100	92	100	50	100	83
	ORF 118	89	92	100	42	38	67
	ORF 124	89	92	100	58	100	100
Protéines membranaires	ORF 16	100	92	100	50	100	100
	ORF 25	89	92	100	50	100	67
	ORF 41	89	92	100	16	13	0
	ORF 54	89	92	100	50	75	83
	ORF 68	89	92	100	16	63	83
	ORF 72	89	92	100	58	100	83
	ORF 77	89	92	100	16	50	33
	ORF 84	100	100	100	67	75	67
	ORF 103	89	92	100	25	25	33
	ORF 111	89	92	100	67	100	33
Inhibiteur d'apoptose	ORF42	100	92	100	67	100	50
	ORF 87	100	92	100	50	100	100
	ORF 99	89	92	100	58	100	83
	ORF 106	100	92	100	58	100	83
		n=12	n=12	n=8	n=12	n=8	n=6

La comparaison de l'ensemble des expériences réalisées au cours de cette thèse révèle un pourcentage d'individus exprimant des ORFs nettement différent entre les animaux survivants et les animaux morts (peu sensibles et fortement sensibles). En effet, les matériels biologiques considérés comme très sensibles (0 % de survie pour le matériel issu : de l'article 1, de la famille A et des animaux injectés Tris-NaCl) révèlent que 88 et 100% des individus sont positifs pour les 39 ORFs. Au contraire, les résultats sont plus disparates, entre 0 et 100% des individus positifs pour les transcrits viraux au sein des animaux peu sensibles (Famille P, dsRNA et 2). Le choix du tissu (manteau versus branchie) pourrait expliquer ces différences.

Parmi les 39 ORFs étudiés, ceux codant pour les inhibiteurs d'apoptose (ORF 42, ORF 87, ORF 99 et ORF 106) sont largement exprimés chez les individus sensibles et moins sensibles. Aucun IAP n'a été rapporté chez les autres herpesvirus à l'exception du KSHV (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus). Pour ce virus, le gène K7 a été décrit comme un IAP (Wang *et al.*, 2002). Ce gène code pour une glycoprotéine possédant les domaines BH2 et BIR. Wang et coll. 2002, montrent que ces domaines sont capables de se lier respectivement à Bcl-2 et à la caspase 3, inhibant ainsi l'activité de cette dernière. K7 serait donc une protéine adaptatrice anti-apoptotique. En outre, l'existence de transcrits K7 à différents temps indique une régulation différentielle de la transcription de ce gène (Wang *et al.*, 2002). Ainsi, chez OsHV-1, les IAPs pourraient être exprimés dans le but d'inhiber l'activité des caspases afin d'éviter la mort cellulaire chez l'hôte (sensibles ou moins sensibles) et de poursuivre la réplication virale.

L'ORF 41, codant pour une protéine membranaire est remarquable car faiblement ou pas détecté chez les individus peu sensibles. Ce gène pourrait coder pour une protéine de structure exprimée uniquement sur les virons matures et ne serait donc exprimé que lors d'infection productive. Il pourrait être aussi un gène très précoce, sa détection serait donc difficile chez des animaux pour lesquels la production virale reste plus limitée. Il serait intéressant, notamment dans le cas de la première hypothèse de tester ce gène par une approche de RNAi.

Les ORF 124, 16 et 87 semblent également d'intérêt car ils sont retrouvés chez 100% des individus adultes et des animaux traités avec de l'ARN db, alors que les autres gènes viraux

ne sont pas systématiquement retrouvés chez l'ensemble des individus analysés. Ces gènes pourraient être des marqueurs potentiels d'infection chez des animaux asymptomatiques et la recherche de leurs transcrits pourrait être d'intérêt pour identifier le statut des animaux en particulier en absence de mortalité.

L'ensemble de nos résultats de thèse converge dans le même sens, et renforce l'hypothèse d'une réplication virale moins importante chez les animaux sélectionnés génétiquement. Néanmoins, ces travaux demanderaient à être complétés et validés par des approches de protéomiques (Western-blot, gel 3D, immunohistochimie). L'étude de protéines virales permettrait notamment de valider l'hypothèse d'une expression séquentielle chez OsHV-1, largement décrite chez les autres herpesvirus.

Enfin, le développement de la culture cellulaire permettrait, entre autre, des études fonctionnelles des gènes viraux et une meilleure compréhension du cycle virale.

II.2 Le rôle de la réponse immunitaire ?

Nous avons exploré la réponse immunitaire de l'huître creuse au travers du suivi de l'expression de certains gènes cellulaires à différents stades de développement (naissain et adultes) et par l'approche d'ARN interférence.

Nos travaux mettent en évidence la sur-expression de plusieurs gènes de la voie NF- κ B (MyD88 et I κ B2) chez les individus appartenant à la famille la plus sensible comparée aux huîtres de la famille la moins sensible. Ce résultat est en accord avec les travaux de Fleury et Huvet (2012). Normand et coll. (2014) ont montré que l'expression du gène I κ B2 augmentait avec la quantité d'ADN viral. Une sur-expression des gènes de cette voie pourrait être considérée plus comme un traceur de l'infection et non pas comme un marqueur d'une réponse immunitaire efficace.

L'inhibition du gène Ikb2 par l'approche d'ARN interférence a été utilisée dans le but d'étudier son implication dans la sensibilité à l'infection. Cependant, le pourcentage de survie des huîtres creuses est similaire entre la condition « ARNdb-Ikb2 » et « ARNdb-GFP ». Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une protection antivirale liée à l'injection de matériel génétique de type ARN double brin, sans que la nature de l'ARN joue un rôle (Green et Montagnani 2013). L'implication du gène Ikb2 dans la survie de l'huître au virus n'a pu être élucidée par ARNi. Ces résultats peuvent en particulier être expliqués par les quantités importantes d'ARNdb utilisées.

Pour le gène IFI44, sa sur-expression chez les animaux appartenant à la famille la moins sensible laisse suspecter une intervention de la protéine dans un mécanisme de défense antiviral. Chez l'homme, IFI44 est activé par le virus de l'hépatite C et induit un état anti-prolifératif dans les cultures cellulaires (Hallen *et al.*, 2007). Cependant, sa fonction reste inconnue. Green et coll. (2009) ont rapporté un gène homologue chez l'huître de Sydney, *S. glomerata* dont l'expression était significativement sur-régulée chez les animaux présentant une néoplasie. Fait intéressant, ces auteurs ont suggéré que l'agent étiologique de la néoplasie chez *S. glomerata* pourrait être un virus (Green *et al.*, 2009). De plus, les travaux de Renault et coll. (2011) montrent également une sur-expression de ce gène chez *Crassostrea gigas* en présence du virus OsHV-1. Enfin, Krasnov et coll. (2013) décrivent le gène IFI44 comme un gène antiviral fortement exprimé chez la morue (*Gadus morhua* L) en contact avec le virus de la nécrose nerveuse.

Le Glypican 6 appartenant à la famille des protéoglycanes de type sulfate d'héparane, pourrait avoir un rôle dans la liaison du virus à la surface des cellules cibles. Or, le niveau de ce gène a été rapporté comme étant sous exprimé chez les individus peu sensible comparé aux animaux appartenant à la famille la plus sensible. Nous spéculons alors que les huîtres peu sensibles pourraient être capables de réguler le niveau d'expression de ce gène. En particulier, en début d'infection virale, la réduction de l'expression de ce gène pourrait induire une présence moindre de la protéine à la surface des cellules et rendre la reconnaissance, la fixation et l'entrée du virus plus aléatoire. Il est alors possible de suspecter que le nombre de cellules infectées serait alors réduit laissant aux animaux le temps de développer une réponse immunitaire efficace. Cependant, cette sous-expression n'est pas observée chez les huîtres

adultes alors que ces derniers sont considérés comme peu sensibles à l'infection virale. Cependant, il est important de rappeler que dans nos travaux, les animaux adultes utilisés ont été détectés comme positifs pour la présence d'ADN viral et que de ce fait, les réponses observées peuvent être différentes par rapport à des animaux subissant une primo-infection. Une stimulation continue des activités de défense chez les huîtres adultes pourrait en particulier être liée à un contact préalable avec le virus et une persistance/latence au sein des animaux.

De plus, une forte expression du gène IAP (inhibiteur de l'apoptose) a été observée dès 10 hpi chez les huîtres adultes infectées. Ceci laisse suggérer une augmentation de l'apoptose dans les premiers stades de l'infection par OsHV-1, permettant ainsi à l'huître de limiter précocement la réplication et la dispersion du virus dans l'organisme. Cependant, un phénomène d'apoptose non régulé pourrait être en partie à l'origine des mortalités observées chez les huîtres comme cela a pu être rapporté chez les crevettes pénéides infectées par des virus (Flegel, 2007). Une capacité accrue à limiter ce phénomène au travers d'une forte production d'IAP pourrait permettre aux animaux de réduire le nombre de cellules apoptotiques et de limiter les lésions tissulaires liées à ce phénomène.

II.3 Une certaine mémoire pour mieux se défendre?

Les travaux entrepris chez les huîtres adultes, ont permis de mettre en évidence une détection d'ADN viral avant même l'injection d'OsHV-1. Or, les huîtres au stade adulte ne présentaient pas de mortalité avant le début des expérimentations. Lors d'infection expérimentale, les animaux ont été « surinfectés » au travers d'une injection d'une suspension virale et ont présenté un faible taux de mortalité après cette injection. Ainsi, l'hypothèse d'une forme de mémoire immunitaire chez l'huître creuse peut être formulée. Ce phénomène a été décrit chez un papillon (*Plodia interpunctella*). Exposé à une faible dose de virus, ce dernier est moins sensible lors d'une seconde infection expérimentale (Tidbury *et al.*, 2011). Chez *C. gigas*, Zhang et coll. (2014) ont récemment montré qu'une première stimulation avec *V. splendidus* conduisait à l'amorçage immunitaire chez l'huître avec une amélioration de la phagocytose et une augmentation des hémocytes circulants lors d'une seconde stimulation par la même

bactérie. Enfin, (Barbosa-Solomieu *et al.* (2005) ont suggéré une transmission trans-générationnelle d'une résistance à l'infection chez *C. gigas* face à OsHV-1.

La validation du priming serait une étape clé dans la compréhension de la réponse immunitaire chez *C. gigas*. Des infections à faible dose (afin d'obtenir un nombre important de survivants) pourraient être envisagées, suivi de ré-infections successives (à plusieurs mois d'intervalles) chez les animaux survivants.

II.4 Des animaux réservoirs du virus : latence/persistance du virus ?

Par ailleurs, l'ensemble des résultats obtenus durant cette thèse nous conduit à poser la question de la persistance/latence chez OsHV-1. Chez les herpesvirus infectant les vertébrés, le phénomène de latence est bien décrit (Preston, 2000). Cependant, chez OsHV-1, cette question reste en suspens. Néanmoins, nous avons montré que chez les individus appartenant à une famille peu sensible à l'infection virale au stade naissain et chez les huîtres adultes, l'infection virale était suivie d'une phase au cours de laquelle il y avait absence de détection d'ARN viraux. Ceci suggérant que (i) soit le virus est capable d'entrer en persistance/latence, (ii) soit certaines huîtres sont capables de guérir et de se débarrasser du virus. Si la première hypothèse est considérée, cela suppose qu'après avoir été infectés et avoir survécu à cette infection, les individus les moins sensibles pourraient être un réservoir potentiel pour le virus d'OsHV-1. Des individus présentant une faible sensibilité à l'infection virale ont été rapportés à différents stades de développement (larves, naissain et adultes). Ces résultats laissent penser qu'à ces différents stades de développement certains individus sont capables après infection d'une rémission et pourraient être des porteurs du virus sans exprimer de symptômes facilement observables. De plus, il a pu être montré que des naissains ne présentant pas de mortalités ou de faibles mortalités pouvaient excréter le virus. Nous pourrions également nous demander si le réservoir permanent d'OsHV-1 ne se situe pas chez une autre espèce ne présentant aucun signe de mortalité.

Dans ce contexte, il est pertinent de garder à l'esprit que des animaux ne manifestant pas de symptômes peuvent être des sources du virus, notamment dans une approche de sélection d'animaux plus résistants à l'infection virale. L'absence de mortalité n'est pas synonyme d'absence d'infection et d'absence de risque de transmission. Des travaux récents ont montré que dans le milieu extérieur une augmentation du pourcentage d'individus positifs pour la détection d'ADN viral pouvait être observée en absence de mortalité laissant suspecter la circulation du virus dans les populations d'huîtres creuses de manière « silencieuse » (absence de mortalité) (Renault *et al.*, 2014).

Des expérimentations en conditions de stress (choc thermique par exemple) demanderaient à être réalisées chez les individus survivants, le virus pourrait alors « sortir » de latence (Petton *et al.*, 2013). Une approche de RNAseq permettrait une meilleure visibilité de l'ensemble des 129 ORFs exprimés ou non au cours de l'infection. Cette approche pourrait être utilisée chez des animaux survivants dans le but de caractériser le(s) gène(s) ou d'autres transcrits impliqué(s) dans la latence (si elle existe).

Enfin, pour compléter ces travaux, le mode d'infection telle que la cohabitation devrait également être testé dans un premier temps car il est plus représentatif du milieu naturel. Par la suite, les facteurs de risques environnementaux (favorisant l'infection) pourront être envisagés (localisation géographique, infections multiples, transferts d'animaux..).

Pour finir, ce travail de thèse a permis de proposer un cycle d'infection hypothétique (**Figure 32**, p235). Les principaux axes de recherche et perspectives de cette thèse sont ainsi présentés sous la forme d'un bilan synthétique (**Tableau IV**, p228).

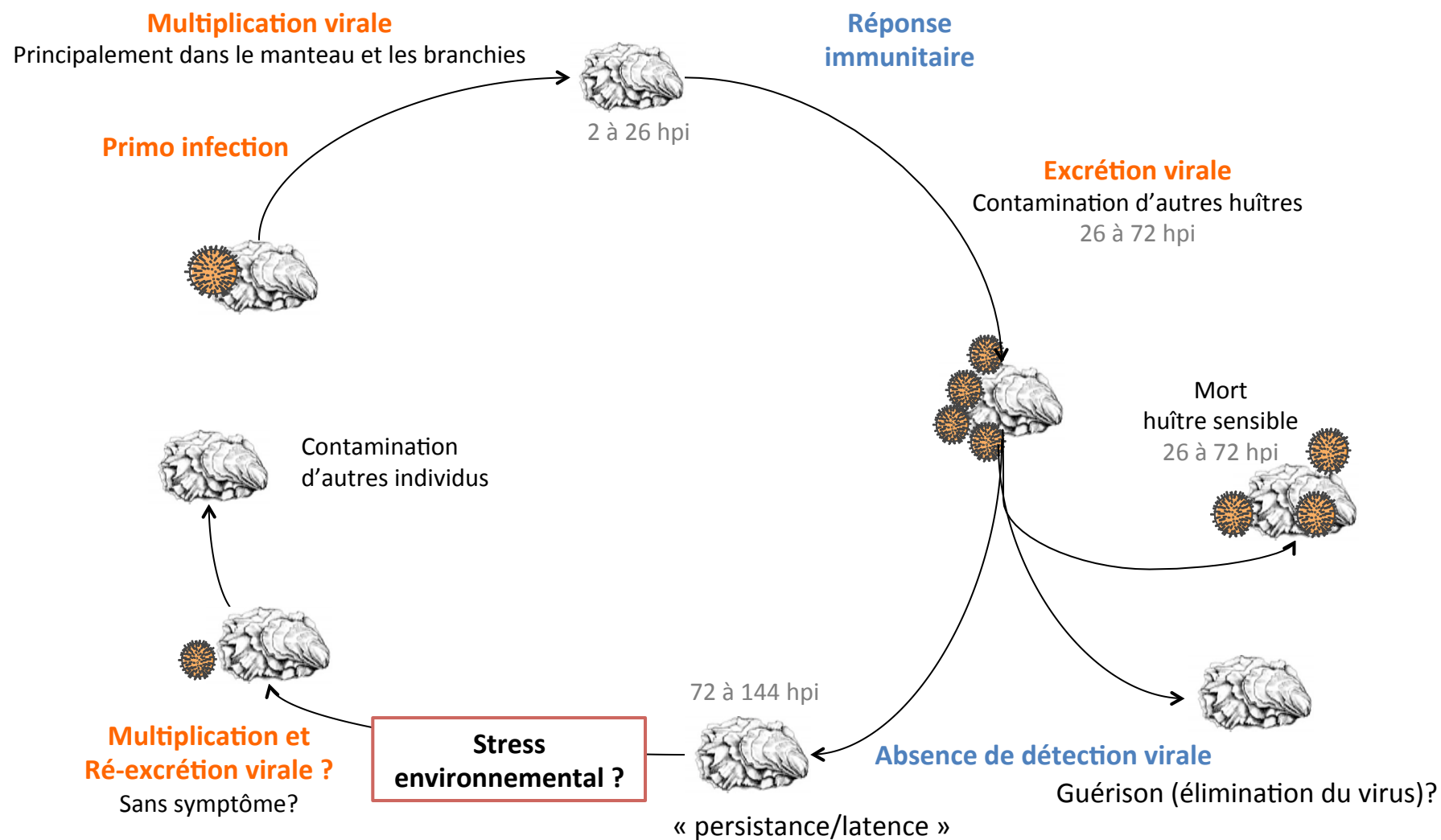


Figure 32: Schéma hypothétique des différentes étapes d'infection d'OsHV-1 en milieu nature

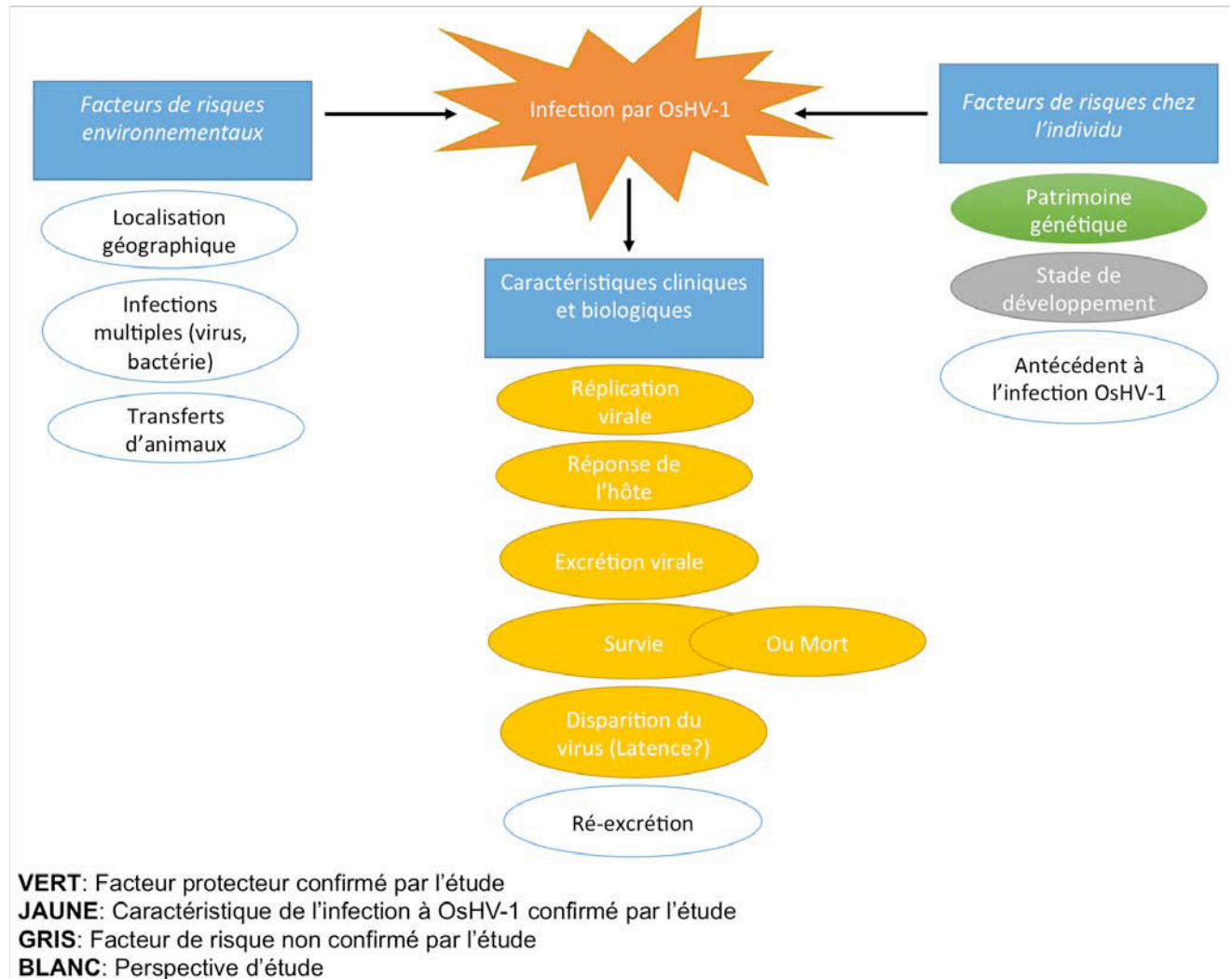


Figure 33: Bilan de la thèse : principaux résultats et perspectives

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anderson, J., Hedgecock, D., Berrigan, M., Criddle, K., Dewey, W., Ford, S., Gouletquer, P., Hildreth, R., Paolisso, M., Targett, N., 2004. Nonnative oysters in Chesapeake Bay. The National Academies Press, Washington DC.
- Arumugan, M., Romestand, B., Torreilles, J., 2000. Nitrite released in haemocytes from *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas* and *Ruditapes decussatus* upon stimulation with phorbol myristate acetate. *Aquat. Living Resour.* 13, 173–177. doi:10.1016/S0990-7440(00)00150-9
- Arzul, I., Nicolas, J.-L., Davison, A.J., Renault, T., 2001a. French Scallops: A New Host for Ostreid Herpesvirus-1. *Virology* 290, 342–349. doi:10.1006/viro.2001.1186
- Arzul, I., Renault, T., Lipart, C., 2001b. Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves: demonstration of interspecies transmission. *Dis. Aquat. Organ.* 46, 1–6. doi:10.3354/dao046001
- Arzul, I., Renault, T., Lipart, C., Davison, A.J., 2001c. Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *J. Gen. Virol.* 82, 865–870.
- Arzul, I., Renault, T., Thébault, A., Gérard, A., 2002. Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Res.* 84, 151–160.
- Babior, B.M., 1984. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood* 64, 959–966.
- Barbosa-Solomieu, V., Dégremont, L., Vázquez-Juárez, R., Ascencio-Valle, F., Boudry, P., Renault, T., 2005. Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1) detection among three successive generations of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Virus Res.* 107, 47–56. doi:10.1016/j.virusres.2004.06.012
- Barbosa-Solomieu, V., Miossec, L., Vázquez-Juárez, R., Ascencio-Valle, F., Renault, T., 2004. Diagnosis of Ostreid herpesvirus 1 in fixed paraffin-embedded archival samples using PCR and in situ hybridisation. *J. Virol. Methods* 119, 65–72. doi:10.1016/j.jviromet.2004.02.007
- Beattie, J.H., Chew, K.K., Hershberger, W.K., 1980. Differential survival of selected strains of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during summer mortality. in: *Proceedings National Shellfisheries Association* 70, 184–189.
- Beattie, J.H., Davis, J.P., Downing, S.L., Chew, K.K., 1988. Summer mortality of Pacific oysters. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* 18, 265–268.
- Ben-Porat, T., Tokazewski, S.A., 1977. Replication of herpesvirus DNA II. Sedimentation characteristics of newly synthesized DNA. *Virology* 79, 292–301. doi:10.1016/0042-6822(77)90356-7
- Bernard, I., 2011. Écologie de la reproduction de l’huître creuse, *Crassostrea gigas*, sur les côtes atlantiques françaises: vers une explication de la variabilité du captage. Université de La Rochelle.
- Biesaga, B., Szostek, S., Klimek, M., Jakubowicz, J., Wysocka, J., 2012. Comparison of the sensitivity and specificity of real-time PCR and in situ hybridization in HPV16 and 18 detection in archival cervical cancer specimens. *Folia Histochem. Cytobiol.* 50, 239–247. doi:10.5603/FHC.2012.0033
- Black, J.B., Sanderlin, K.C., Goldsmith, C.S., Gary, H.E., Lopez, C., Pellett, P.E., 1989. Growth properties of human herpesvirus-6 strain Z29. *J. Virol. Methods* 26, 133–145.
- Bodoy, A., Garnier, J., Razet, D., Geairon, P., 1990. Mass mortalities of oysters (*Crassostrea gigas*) during spring 1988 in the Bay of Marennes-Oleron, related to environmental conditions. Presented at the CIEM Conseil International pour l’Exploration de la mer.
- Bonami, J.R., 1977. Les maladies virales des crustacés et des mollusques. *Oceanis* 3.
- Bower, S.M., Goh, B., Meyer, G.R., Carnegie, R.B., Gee, A., 2005. Epizootiology and detection of nocardiosis in oysters. *Dis. Asian Aquac.* V 249–262.

- Bower, S.M., McGladdery, S.E., 2003. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. Department of Fisheries and Oceans, Canada.
- Burge, C.A., Friedman, C.S., 2012. Quantifying Ostreid Herpesvirus (OsHV-1) Genome Copies and Expression during Transmission. *Microb. Ecol.* 63, 596–604. doi:10.1007/s00248-011-9937-1
- Burge, C.A., Griffin, F.J., Friedman, C.S., 2006. Mortality and herpesvirus infections of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Tomales Bay, California, USA. *Dis. Aquat. Organ.* 72, 31–43. doi:10.3354/dao072031
- Burge, C., Judah, L., Conquest, L., Griffin, F., Cheney, D., Suhrbier, A., Vadopalas, B., Olin, P.G., Renault, T., Friedman, C.S., 2007. Summer seed mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg grown in Tomales Bay, California, USA : the influence of oyster stock, planting time, pathogens, and environmental stressors. *J. Shellfish Res.* 26, 163–172.
- Buroker, N.E., 1983. Sexuality with respect to shell length and group size in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Malacologia* 23, 271–279.
- Calvo, G.W., Luckenbach, M.W., Allen Jr, S.K., Bureson, E.M., 2001. A comparative field study of *Crassostrea ariakensis* (Fujita 1913) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. *J. Shellfish Res.* 20, 221–230.
- Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hetru, C., Hoffmann, J.A., Bulet, P., 1996. Innate Immunity Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* 271, 21808–21813. doi:10.1074/jbc.271.36.21808
- Chaves, A.J., Busquets, N., Campos, N., Ramis, A., Dolz, R., Rivas, R., Valle, R., Abad, F.X., Darji, A., Majo, N., 2011. Pathogenesis of highly pathogenic avian influenza A virus (H7N1) infection in chickens inoculated with three different doses. *Avian Pathol. J. WVPA* 40, 163–172. doi:10.1080/03079457.2011.551874
- Chavez-Villalba, J., Cochard, J.-C., le Pennec, M., Barret, J., Enriquez-Diaz, M., Caceres-Martinez, C., 2003. Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* 22, 721–732.
- Cheng, T., 1981. Invertebrate blood cells. *Acad. Press Lond.*
- Choi, S.H., Jee, B.Y., Lee, S.J., Cho, M.Y., Lee, S.J., Kim, J.W., Jeong, H.D., Kim, K.H., 2013. Effects of RNA interference-mediated knock-down of hypoxia-inducible factor- α on respiratory burst activity of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* hemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 476–479. doi:10.1016/j.fsi.2013.05.001
- Comps, M., Bonami, J.-R., 1977. Infection virale associée à des mortalités chez l’huître *Crassostrea gigas* Thunberg. *Comptes Rendus Académie Sci. Paris Académie Sci.* 285, 1139–1140.
- Comps, M., Bonami, J.-R., Vago, C., 1976. Une virose de l’huître portugaise (*Crassostrea angulata*). *Comptes Rendus Académie Sci. Paris Sér. D* 282, 139–143.
- Comps, M., Park, M.S., Desportes, I., 1986. Etude ultrastructurale des Marteilioides chungmuensis NG, N. SP. parasite des ovocytes de l’huître *Crassostrea gigas* Th. *Protistologica* 22, 279–285.
- Compton, T., 2004. Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends Cell Biol.* 14, 5–8. doi:10.1016/j.tcb.2003.10.009
- Costil, K., Royer, J., Ropert, M., Soletchnik, P., Mathieu, M., 2005. Spatio-temporal variations in biological performances and summer mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Normandy (France). *Helgol. Mar. Res.* 59, 286–300. doi:10.1007/s10152-005-0004-5

- Dang, V.T., Benkendorff, K., Speck, P., 2011. In vitro antiviral activity against herpes simplex virus in the abalone *Haliotis laevis*. J. Gen. Virol. 92, 627–637. doi:10.1099/vir.0.025247-0
- Dargan, D.J., Subak-Sharpe, J.H., 1997. The effect of herpes simplex virus type 1 L-particles on virus entry, replication, and the infectivity of naked herpesvirus DNA. Virology 239, 378–388. doi:10.1006/viro.1997.8893
- Davison, A.J., 2002. Evolution of the herpesviruses. Vet. Microbiol. 86, 69–88.
- Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., Thiry, E., 2009. The order Herpesvirales. Arch. Virol. 154, 171–177. doi:10.1007/s00705-008-0278-4
- Davison, 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. doi:10.1099/vir.0.80382-0
- De Decker, S., Reynaud, Y., Saulnier, D., 2013. First molecular evidence of cross-species induction of metalloprotease gene expression in *Vibrio* strains pathogenic for Pacific oyster *Crassostrea gigas* involving a quorum sensing system. Aquaculture 392-395, 1–7. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.01.033
- Defer, D., 2009. Recherche d'activités antimicrobiennes chez des mollusques marins. Purification et caractérisation partielle de peptides antimicrobiens isolés à partir de l'hémolymphe de *Crassostrea gigas* et de bactéries associées. Université de Bretagne Sud.
- Dégremont, L., 2011. Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. Aquaculture 317, 94–98. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.04.029
- Dégremont, L., 2013. Size and genotype affect resistance to mortality caused by OsHV-1 in *Crassostrea gigas*. Aquaculture 416-417, 129-134, doi:10.1016/j.aquaculture.2013.09.011
- Dégremont, L., Bédier, E., Boudry, P., 2010. Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). II. Response to selection for survival and its influence on growth and yield. Aquaculture 299, 21–29.
- Dégremont, L., Bédier, E., Soletchnik, P., Ropert, M., Huvet, A., Moal, J., Samain, J.-F., Boudry, P., 2005. Relative importance of family, site, and field placement timing on survival, growth, and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). Aquaculture 249, 213–229. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.03.046
- Dégremont, L., Guyader, T., Tourbiez, D., Pépin, J.-F., 2013. Is horizontal transmission of the Ostreid herpesvirus OsHV-1 in *Crassostrea gigas* affected by unselected or selected survival status in adults to juveniles? Aquaculture 408-409, 51–57. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.05.025
- Deniau, S., 2000. Essais de propagation in vitro de virus de type herpès infectant les mollusques bivalves marins et contribution à l'étude des interactions hôte-virus. Ecole Pratique des Hautes Etudes.
- Deuff, R.-M.L., Lipart, C., Renault, T., 1994. Primary culture of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, heart cells. J. Tissue Cult. Methods 16, 67–72. doi:10.1007/BF01404838
- De Zoysa, M., Kang, H.-S., Song, Y.-B., Jee, Y., Lee, Y.-D., Lee, J., 2007. First report of invertebrate Mx: cloning, characterization and expression analysis of Mx cDNA in disk abalone (*Haliotis discus discus*). Fish Shellfish Immunol. 23, 86–96. doi:10.1016/j.fsi.2006.09.007
- Dyrynda, E.A., Pipe, R.K., Ratcliffe, N.A., 1995. Host defence mechanisms in marine invertebrate larvae. Fish Shellfish Immunol. 5, 569–580. doi:10.1016/S1050-4648(95)80042-5

- Edington, N., Welch, H.M., Griffiths, L., 1994. The prevalence of latent Equid herpesviruses in the tissues of 40 abattoir horses. *Equine Vet. J.* 26, 140–142.
- EFSA <http://www.efsa.europa.eu/fr/>
- El-Matbouli, M., Soliman, H., 2011. Transmission of Cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3) from goldfish to naïve common carp by cohabitation. *Res. Vet. Sci.* 90, 536–539. doi:10.1016/j.rvsc.2010.07.008
- Elston, R., 1979. Viruslike particles associated with lesions in larval pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *J. Invertebr. Pathol.* 33, 71–74.
- Elston, R., 1980. Functional morphology of the coelomocytes of the larval oysters (*Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*). *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 60, 947–957. doi:10.1017/S0025315400042004
- Elston, R.A., Hasegawa, H., Humphrey, K.L., Polyak, I.K., Hase, C.C., 2008. Re-emergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: severity, environmental drivers, geographic extent and management. *Dis. Aquat. Organ.* 82, 119.
- Elston, R.A., Wilkinson, M.T., 1985. Pathology, management and diagnosis of oyster velar virus disease (OVVD). *Aquaculture* 48, 189–210.
- Enriquez-Diaz, M., Pouvreau, S., Fabioux, C., Le Coguc, Y., Cochard, J.C., Le Pennec, M., 2003. Reproductive strategy: Variability of reproductive pattern in two populations of genetically determined *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* 22, 328.
- Fabioux, C., Corporeau, C., Quillien, V., Favrel, P., Huvet, A., 2009. *In vivo* RNA interference in oyster - *vasa* silencing inhibits germ cell development. *FEBS J.* 276, 2566–2573. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.06982.x
- Fabioux, C., Huvet, A., Lelong, C., Robert, R., Pouvreau, S., Daniel, J.Y., Minguant, C., Le Pennec, M., 2004. Oyster *vasa*-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 592–598. doi:10.1016/j.bbrc.2004.06.009
- Fang, D., Xu, G., Hu, Y., Pan, C., Xie, L., Zhang, R., 2011. Identification of genes directly involved in shell formation and their functions in pearl oyster, *Pinctada fucata*. *PloS One* 6, e21860. doi:10.1371/journal.pone.0021860
- FAO www.fao.org. URL www.fao.org
- Farley, C.A., Banfield, W.G., Kasnic, G., Foster, W.S., 1972. Oyster Herpes-Type Virus. *Science* 178, 759–760. doi:10.1126/science.178.4062.759
- Farley, C.A., Lewis, E.J., Relyea, D., Zahtila, J., Rivara, G., 1998. Resistance studies for juvenile oyster disease (JOD) 1997: Some early insights into genetic aspects. *J. Shellfish Res.* 17, 352–353.
- Farley, C.A., Wolf, P.H., Elston, R.A., 1988. A long-term study of “microcell” disease in oysters with a description of a new genus, *Mikrocytos* (gn), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp. n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp. n.). *Fish. Bull.* 86, 581–593.
- Feng, S.Y., 1988. Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. *Am Fish Soc Spec Publ* 18, 153–168.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811. doi:10.1038/35888
- Flegel, T.W., 2007. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 217–231. doi:10.1016/j.dci.2006.06.009
- Fleury, E., Huvet, A., 2012. Microarray Analysis Highlights Immune Response of Pacific Oysters as a Determinant of Resistance to Summer Mortality. *Mar. Biotechnol.* 14, 203–217. doi:10.1007/s10126-011-9403-6

- Fleury, E., Moal, J., Boulo, V., Daniel, J.-Y., Mazurais, D., Hénaut, A., Corporeau, C., Boudry, P., Favrel, P., Huvet, A., 2009. Microarray-Based Identification of Gonad Transcripts Differentially Expressed Between Lines of Pacific Oyster Selected to Be Resistant or Susceptible to Summer Mortality. *Mar. Biotechnol.* 12, 326–339. doi:10.1007/s10126-009-9227-9
- Fleury, P.G., Goyard, E., Mazurié, J., Claude, S., Bouget, J.F., Langlade, A., Coguic, Y.L., 2001. The assessing of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) rearing performances by the IFREMER/REMORA network: method and first results (1993–98) in Brittany (France). *Hydrobiologia* 465, 195–208. doi:10.1023/A:1014531128458
- Friedman, C.S., Beattie, J.H., Elston, R.A., Hedrick, R.P., 1991. Investigation of the relationship between the presence of a Gram-positive bacterial infection and summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Aquaculture* 94, 1–15.
- Friedman, C.S., Estes, R.M., Stokes, N.A., Burge, C.A., Hargove, J.S., Barber, B.J., Elston, R.A., Burrenson, E.M., Reece, K.S., 2005. Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Dis. Aquat. Organ.* 63, 33–41. doi:10.3354/dao063033
- Galloway, T.S., Depledge, M.H., 2001. Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology* 10, 5–23.
- Galtsoff, P., 1964. The American Oyster *Crassostrea Virginica* Gmelin, First Edition edition. ed. U. S. Government Printing.
- Garcia-Blanco, M.A., Cullen, B.R., 1991. Molecular basis of latency in pathogenic human viruses. *Science* 254, 815–820.
- Garcia, C., Robert, M., Arzul, I., Chollet, B., Joly, J.-P., Miossec, L., Comtet, T., Berthe, F., 2006. Viral gametocytic hypertrophy of *Crassostrea gigas* in France : from occasional records to disease emergence? *Dis. Aquat. Organ.* 70, 193–199.
- Garcia, C., Thébault, A., Dégremont, L., Arzul, I., Miossec, L., Robert, M., Chollet, B., François, C., Joly, J.-P., Ferrand, S., Kerdudou, N., Renault, T., 2011. Ostreid herpesvirus 1 detection and relationship with *Crassostrea gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. *Vet. Res.* 42, 73. doi:10.1186/1297-9716-42-73
- Garnier, M., Labreuche, Y., Garcia, C., Robert, M., Nicolas, J.-L., 2007. Evidence for the Involvement of Pathogenic Bacteria in Summer Mortalities of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Microb. Ecol.* 53, 187–196. doi:10.1007/s00248-006-9061-9
- Garnier, M., Labreuche, Y., Nicolas, J.-L., 2008. Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 358–365. doi:10.1016/j.syapm.2008.06.003
- Gavery, M.R., Roberts, S.B., 2012. Characterizing short read sequencing for gene discovery and RNA-Seq analysis in *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* 7, 94–99. doi:10.1016/j.cbd.2011.12.003
- Gay, M., Renault, T., Pons, A.-M., Le Roux, F., 2004. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Dis. Aquat. Organ.* 62, 65–74.
- Gerard, A., Naciri-Graven, Y., Boudry, P., Launey, S., Heurtebise, S., Ledu, C., Phelipot, P., 1995. Contrôle de la gamétogénèse des huîtres creuses et plates. Relations“ reproduction” et“ génétique,” in: Groupe de Travail Sur La Reproduction Des Mollusques. Bivalves Aquaculture Marine.
- Gestal, C., Roch, P., Renault, T., Pallavicini, A., Paillard, C., Novoa, B., Oubella, R., Venier, P., Figueras, A., 2008. Study of diseases and the immune system of bivalves using molecular biology and genomics. *Rev. Fish. Sci.* 16, 133–156.

- Goulletquer, P., Héral, M., 1997. Marine molluscan production trends in France: from fisheries to aquaculture. NOAA Tech Rep NMFS 129.
- Goulletquer, P., Soletchnik, P., Le Moine, O., Razet, D., Geairon, P., Faury, N., 1998. Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oleron (France). Presented at the CIEM Conseil International pour l'Exploration de la mer.
- Green, T.J., Barnes, A.C., 2009. Inhibitor of REL/NF-KB is regulated in Sydney rock oysters in response to specific double-stranded RNA and *Vibrio alginolyticus*, but the major immune anti-oxidants EcSOD and Prx6 are non-inducible. *Fish Shellfish Immunol.* 27, 260–265. doi:10.1016/j.fsi.2009.05.005
- 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. doi:10.1016/j.fsi.2009.03.003
- Green, T.J., Montagnani, C., 2013. Poly I:C induces a protective antiviral immune response in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against subsequent challenge with Ostreid herpesvirus (OsHV-1 μ var). *Fish Shellfish Immunol.* 35, 382–388. doi:10.1016/j.fsi.2013.04.051
- Green, T.J., Robinson, N., Chataway, T., Benkendorff, K., O'Connor, W., Speck, P., 2014. Evidence that the major hemolymph protein of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, has antiviral activity against herpesviruses. *Antiviral Res.* doi:10.1016/j.antiviral.2014.08.010
- Grizel, H., Héral, M., 1991. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Cons. ICES J. Mar. Sci.* 47, 399–403.
- Gueguen, Y., Cadoret, J.-P., Flament, D., Barreau-Roumiguère, 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. doi:10.1016/S0378-1119(02)01149-6
- Guichard, B., Francois, C., Joly, J.-P., Garcia, C., Saulnier, D., Pepin, J.-F., Arzul, I., Omnes, E., Tourbiez, D., Faury, N., Haffner, P., Chollet, B., Robert, M., Renault, T., Rauflet, F., Le Gagneur, E., Ropert, M., Mouillard, G., Gerla, D., Annezo, J.-P., Le Gal, D., Langlade, A., Bedier, E., Brerette, S., Chabirand, J.-M., Grizon, J., Robert, S., Courtois, O., Rumebe, M., Cantin, C., 2011. Bilan 2010 du réseau Repamo - Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins.
- Guo, P., Coban, O., Snead, N.M., Trebley, J., Hoepflich, S., Guo, S., Shu, Y., 2010. Engineering RNA for Targeted siRNA Delivery and Medical Application. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62, 650–666. doi:10.1016/j.addr.2010.03.008
- 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- α -inducible protein IFI44. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 27, 675–680. doi:10.1089/jir.2007.0021
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.J., 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293–296. doi:10.1038/35005107
- Haskin, H.H and Andrews J.D.(1988). Uncertainties and speculations about the life cycle of the 167 eastern oyster pathogen *Haplosporidium nelson* (MSX). In: Disease Processes in Marine Bivalve 168 Molluscs, Fisher W.S., ed. Amer. Fish. Soc. Spec. Publ. 18. Bethesda, Maryland, USA, 5–22.
- Hellio, C., Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Renault, T., Thomas-Guyon, H., 2007. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in

- Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in vitro. Fish Shellfish Immunol. 22, 433–440. doi:10.1016/j.fsi.2006.06.014
- Hine, P.M., Thorne, T., 1997. Replication of herpes-like viruses in haemocytes of adult flat oysters *Ostrea angasi*: an ultrastructural study. Dis. Aquat. Organ. 29, 189–196. doi:10.3354/dao029189
- Hine, P.M., Wesney, B., Hay, B.E., 1992. Herpesviruses associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea gigas*. Dis. Aquat. Organ. 12, 135–142.
- Honess, R.W., 1984. Herpes Simplex and “The Herpes Complex”: Diverse Observations and A Unifying Hypothesis. J. Gen. Virol. 65, 2077–2107. doi:10.1099/0022-1317-65-12-2077
- Honess, R.W., Roizman, B., 1974. Regulation of Herpesvirus Macromolecular Synthesis I. Cascade Regulation of the Synthesis of Three Groups of Viral Proteins 1. J. Virol. 14, 8–19.
- Huang, C., Zhang, X., Gin, K.Y., Qin, Q.W., 2004. In situ hybridization of a marine fish virus, Singapore grouper iridovirus with a nucleic acid probe of major capsid protein. J. Virol. Methods 117, 123–128. doi:10.1016/j.jviromet.2004.01.002
- Huvet, A., Fleury, E., Corporeau, C., Quillien, V., Daniel, J.Y., Riviere, G., Boudry, P., Fabioux, C., 2012. In Vivo RNA Interference of a Gonad-Specific Transforming Growth Factor- β in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. Mar. Biotechnol. 14, 402–410. doi:10.1007/s10126-011-9421-4
- Huvet, A., Herpin, A., Dégremont, L., Labreuche, Y., Samain, J.-F., Cunningham, C., 2004. The identification of genes from the oyster, *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. Gene 343, 211–220.
- Imai, T., Numachi, K., Oizumi, J., Sato, S., 1965. Studies on the Mass Mortality of the Oyster in Matsushima Bay II. Search for the Cause of Mass Mortality and the Possibility to Prevent it by Transplantation Experiment. Bull. Tohoku Natl. Fish. Res. Inst. Shioyama 27–38.
- Itoh, N., Oda, T., Yoshinaga, T., Ogawa, K., 2003. Isolation and 18S ribosomal DNA gene sequences of *Marteilioides chungmuensis* (Paramyxea), an ovarian parasite of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Dis. Aquat. Organ. 54, 163–169.
- Jacob, R.J., Roizman, B., 1977. Anatomy of Herpes Simplex Virus DNA. VIII. Properties of the Replicating DNA. J. Virol. 23, 394–411.
- Jeffries, V.E., 1982. Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. Aquaculture 29, 201–226. doi:10.1016/0044-8486(82)90136-3
- Jenkins, C., Hick, P., Gabor, M., Spiers, Z., Fell, S.A., Gu, X., Read, A., Go, J., Dove, M., O'Connor, W., Kirkland, P.D., Frances, J., 2013. Identification and characterisation of an ostreid herpesvirus-1 microvariant (OsHV-1 μ -var) in *Crassostrea gigas* (Pacific oysters) in Australia. Dis. Aquat. Organ. 105, 109–126. doi:10.3354/dao02623
- Jenkins, F.J., Turner, S.L., 1996. Herpes simplex virus: a tool for neuroscientists. Front. Biosci. J. Virtual Libr. 1, d241–247.
- Jiao, Y., Wang, H., Du, X., Zhao, X., Wang, Q., Huang, R., Deng, Y., 2012. Dermatopontin, a shell matrix protein gene from pearl oyster *Pinctada martensii*, participates in nacre formation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 425, 679–683. doi:10.1016/j.bbrc.2012.07.099
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., Cossart, P., 2002. An RNA Thermosensor Controls Expression of Virulence Genes in *Listeria monocytogenes*. Cell 110, 551–561.

- Jones, C., 2003. Herpes Simplex Virus Type 1 and Bovine Herpesvirus 1 Latency. Clin. Microbiol. Rev. 16, 79–95. doi:10.1128/CMR.16.1.79-95.2003
- Jouaux, A., Lafont, M., Blin, J.-L., Houssin, M., Mathieu, M., Lelong, C., 2013. Physiological change under OsHV-1 contamination in Pacific oyster *Crassostrea gigas* through massive mortality events on fields. BMC Genomics 14, 590. doi:10.1186/1471-2164-14-590
- Kamaishi, T., Yoshinaga, T., 2002. Detection of Haplosporidium nelsoni in Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Japan. Fish Pathol. 37, 193–196.
- Karpala, A.J., Doran, T.J., Bean, A.G.D., 2005. Immune responses to dsRNA: implications for gene silencing technologies. Immunol. Cell Biol. 83, 211–216. doi:10.1111/j.1440-1711.2005.01331.x
- Kaspar, C.W., Tamplin, M.L., 1993. Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. Appl. Environ. Microbiol. 59, 2425–2429.
- Khanobdee, K., Soowannayan, C., Flegel, T., Ubol, S., Withyachumnarnkul, B., 2002. Evidence for apoptosis correlated with mortality in the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with yellow head virus. Dis. Aquat. Organ. 48, 79–90. doi:10.3354/dao048079
- Kim, D.H., Rossi, J.J., 2007. Strategies for silencing human disease using RNA interference. Nat. Rev. Genet. 8, 173–184. doi:10.1038/nrg2006
- Kimura, T., Yoshimizu, M., Tanaka, M., Sannohe, H., 1981. Studies on a New Virus (OMV) from *Oncorhynchus masou*. I, Characteristics and Pathogenicity. Fish Pathol. 15, 143–147.
- Kleeman, S.N., Adlard, R.D., 2000. Molecular detection of *Marteilia sydneyi*, pathogen of Sydney rock oysters. Dis. Aquat. Organ. 40, 137–146. doi:10.3354/dao040137
- Krasnov, A., Kileng, Ø., Skugor, S., Jørgensen, S.M., Afanasyev, S., Timmerhaus, G., Sommer, A.-I., Jensen, I., 2013. Genomic analysis of the host response to nervous necrosis virus in Atlantic cod (*Gadus morhua*) brain. Mol. Immunol. 54, 443–452. doi:10.1016/j.molimm.2013.01.010
- Labreuche, Y., Soudant, P., Gonçalves, M., Lambert, C., Nicolas, J.-L., 2006. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. Dev. Comp. Immunol. 30, 367–379. doi:10.1016/j.dci.2005.05.003
- Labreuche, Y., Veloso, A., de la Vega, E., Gross, P.S., Chapman, R.W., Browdy, C.L., Warr, G.W., 2010. Non-specific activation of antiviral immunity and induction of RNA interference may engage the same pathway in the Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. Dev. Comp. Immunol. 34, 1209–1218. doi:10.1016/j.dci.2010.06.017
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gelebart, F., Cordevant, C., Lange, M., Poulet, S.A., 2001. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). Dis. Aquat. Organ. 46, 139–145.
- Lambert, C., Nicolas, J.-L., Cilia, V., Corre, S., 1998. *Vibrio pectenicida* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 481–487.
- Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. Biometrics 33, 159–174. doi:10.2307/2529310
- Lauckner, G., 1983. Diseases of mollusca: bivalvia.
- Le Deuff, R.-M., Nicolas, J.-L., Renault, T., Cochenne, N., 1994. Experimental transmission of a herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 14, 69–72.

- Le Deuff, R.-M., Renault, T., 1999. Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. J. Gen. Virol. 80, 1317–1322.
- Le Deuff, R.-M., Renault, T., Gerard, A., 1996. Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Dis. Aquat. Organ. 24, 149–157.
- Leon, M.P. de, Eisenberg, R.J., Cohen, G.H., 1977. Ribonucleotide Reductase from Herpes Simplex Virus (Types 1 and 2) Infected and Uninfected KB Cells: Properties of the Partially Purified Enzymes. J. Gen. Virol. 36, 163–173. doi:10.1099/0022-1317-36-1-163
- Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B., Nicolas, J.-L., Berthe, F., 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. Aquat. Living Resour. 15, 251–258.
- Li, C.P., Prescott, B., Eddy, B., Caldes, G., Green, W.R., Martino, E.C., Young, A.M., 1965. Antiviral activity of paolins from clams. Ann. N. Y. Acad. Sci. 130, 374–382.
- Li, C.P., Prescott, B., Eddy, B.E., Chu, E.W., Martino, E.C., 1968. Studies on Inhibition of Viral Oncogenesis. I. Reduced Tumor Incidence in Hamsters Inoculated With Adenovirus 12 and Treated With Clam Extracts. J. Natl. Cancer Inst. 41, 1249–1253.
- Limasset, P., 1961. Preliminary observations demonstrating the existence of tobacco mosaic virus inhibitors in aquatic animals, mostly marine]. Comptes Rendus Hebd. Séances Académie Sci. 252, 3154.
- Li, M.F., Traxler, G.S., 1972. Antiviral activity of aqueous clam (*Mya arenaria*) extract on amphibian virus (LT-1). Can. J. Microbiol. 18, 397–402.
- Lipart, C., Renault, T., 2002. Herpes-like virus detection in infected *Crassostrea gigas* spat using DIG-labelled probes. J. Virol. Methods 101, 1–10. doi:10.1016/S0166-0934(01)00413-X
- Lorteau, C., Auffret, M., Le Bris, H., 1995. The immunodefense system of bivalves. 1. Structure and working [hemocytes]. Recl. Med. Veterinaire 171.
- Luna Acosta, A., 2010. Les phénoloxydases chez l’huître creuse *Crassostrea gigas* : biomarqueurs potentiels de stress environnemental. La Rochelle.
- Luna-González, A., Maeda-Martínez, A.N., Ascencio-Valle, F., Robles-Mungaray, M., 2004. Ontogenetic variations of hydrolytic enzymes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Fish Shellfish Immunol. 16, 287–294. doi:10.1016/S1050-4648(03)00110-4
- Martenot, C., Oden, E., Travaillé, E., Malas, J.-P., Houssin, M., 2011. Detection of different variants of Ostreid Herpesvirus 1 in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* between 2008 and 2010. Virus Res. 160, 25–31.
- Maurer, D., Comps, M., His, E., 1986. Caractéristiques des mortalités estivales de l’huître *Crassostrea gigas* dans le bassin d’Arcachon. Haliotis 309–317.
- Miller, C.J., Li, Q., Abel, K., Kim, E.-Y., Ma, Z.-M., Wietgreffe, S., Franco-Scheuch, L.L., Compton, L., Duan, L., Shore, M.D., Zupancic, M., Busch, M., Carlis, J., Wolinsky, S., Haase, A.T., 2005. Propagation and Dissemination of Infection after Vaginal Transmission of Simian Immunodeficiency Virus. J. Virol. 79, 9217–9227. doi:10.1128/JVI.79.14.9217-9227.2005
- Minson, A.C., Davison, A., Eberle, R., Desrosiers, R.C., Fleckenstein, B., McGeoch, D.J., Pellet, P.E., Roizman, B., Studdert, D.M.J., 2000. Family herpesviridae. Virus Taxon. Seventh Rep. Int. Comm. Taxon. Viruses 203–225.
- Mitchell, M.S., Matsuzaki, S., Imai, S., Rao, V.B., 2002. Sequence analysis of bacteriophage T4 DNA packaging/terminase genes 16 and 17 reveals a common ATPase center in the large subunit of viral terminases. Nucleic Acids Res. 30, 4009–4021.

- Mitta, Hubert, F., Noël, T., Roch, P., 1999a. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Eur. J. Biochem. 265, 71–78. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00654.x
- Mitta, Vandenbulcke, F., Hubert, F., Roch, P., 1999b. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. J. Cell Sci. 112, 4233–4242.
- Mitta, Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzert, M., Roch, P., 2000. Involvement of Mytilins in Mussel Antimicrobial Defense. J. Biol. Chem. 275, 12954–12962. doi:10.1074/jbc.275.17.12954
- Montagnani, C., Labreuche, Y., Escoubas, J.M., 2008. Cg-IkB, a new member of the IkB protein family characterized in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. Dev. Comp. Immunol. 32, 182–190. doi:10.1016/j.dci.2007.06.001
- Montagnani, C., Le Roux, F., Berthe, F., Escoubas, J.-M., 2001. Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms. FEBS Lett. 500, 64–70. doi:10.1016/S0014-5793(01)02559-5
- Montes, J.F., Durfort, M., García-Valero, J., 1995. Cellular defence mechanism of the clam *Tapes semidecussatus* against infection by the protozoan *Perkinsus* sp. Cell Tissue Res. 279, 529–538. doi:10.1007/BF00318165
- Morga, B., Arzul, I., Faury, N., Segarra, A., Chollet, B., Renault, T., 2011. Molecular responses of *Ostrea edulis* haemocytes to an in vitro infection with *Bonamia ostreae*. Dev. Comp. Immunol. 35, 323–333.
- Mori K, 1968. Changes in oxygen consumption and respiratory quotient in the tissue of oysters during the stages of sexual maturation and spawning. Tohoku J. Agric. Res., 19, 136–143.
- Mu, C., Yu, Y., Zhao, J., Wang, L., Song, X., Zhang, H., Qiu, L., Song, L., 2010. An inhibitor κ B homologue from bay scallop *Argopecten irradians*. Fish Shellfish Immunol. 28, 687–694. doi:10.1016/j.fsi.2010.01.005
- Mweene, A.S., Okazaki, K., Kida, H., 1996. Detection of viral genome in non-neural tissues of cattle experimentally infected with bovine herpesvirus 1. Jpn. J. Vet. Res. 44, 165–174.
- Nell, J.A., Perkins, B., 2006. Evaluation of the progeny of third-generation Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850) breeding lines for resistance to QX disease *Marteilia sydneyi* and winter mortality *Bonamia roughleyi*. Aquac. Res. 37, 693–700.
- Nell, J.A., Smith, I.R., McPhee, C.C., 2000. The Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould 1850) breeding programme: progress and goals. Aquac. Res. 31, 45–49.
- Newcomb, W.W., Homa, F.L., Thomsen, D.R., Booy, F.P., Trus, B.L., Steven, A.C., Spencer, J.V., Brown, J.C., 1996. Assembly of the herpes simplex virus capsid: characterization of intermediates observed during cell-free capsid formation. J. Mol. Biol. 263, 432–446. doi:10.1006/jmbi.1996.0587
- Newcomb, W.W., Homa, F.L., Thomsen, D.R., Trus, B.L., Cheng, N., Steven, A., Booy, F., Brown, J.C., 1999. Assembly of the herpes simplex virus procapsid from purified components and identification of small complexes containing the major capsid and scaffolding proteins. J. Virol. 73, 4239–4250.
- Newcomb, W.W., Trus, B.L., Booy, F.P., Steven, A.C., Wall, J.S., Brown, J.C., 1993. Structure of the herpes simplex virus capsid. Molecular composition of the pentons and the triplexes. J. Mol. Biol. 232, 499–511. doi:10.1006/jmbi.1993.1406
- Nguyen, M.L., Blaho, J.A., 2009. Cellular Players in the Herpes Simplex Virus Dependent Apoptosis Balancing Act. Viruses 1, 965–978. doi:10.3390/v1030965

- Nicolas, J.L., Comps, M., Cochennec, N., 1992. Herpes-like virus infecting Pacific-oyster larvae, *Crassostrea gigas*. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 12.
- Normand, J., Li, R., Quillien, V., Nicolas, J.-L., Boudry, P., Pernet, F., Huvet, A., 2014. Contrasted survival under field or controlled conditions displays associations between mRNA levels of candidate genes and response to OsHV-1 infection in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Mar. Genomics. doi:10.1016/j.margen.2014.02.002
- Numachi, K., Oizumi, J., Sato, S., Imai, T., 1965. Studies on the Mass Mortality of the Oyster in Matsushima Bay III. The Pathological Changes of the Oyster Caused by Gram-Positive Bacteria and the Frequency of Their Infection. Bull. Tohoku Natl. Fish. Res. Inst. Shioyama 39–48.
- Oden, E., Martenot, C., Berthaux, M., Travaillé, E., Malas, J.P., Houssin, M., 2011. Quantification of ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) in *Crassostrea gigas* by real-time PCR: Determination of a viral load threshold to prevent summer mortalities. Aquaculture 317, 27–31. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.04.001
- OIE - World Organisation for Animal Health, Chapter 2.4.9 [WWW Document], 2014. . Oie. URL <http://www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online/> (accessed 8.30.14).
- Olicard, C., Didier, Y., Marty, C., Bourgougnon, N., Renault, T., 2005a. In vitro research of anti-HSV-1 activity in different extracts from Pacific oysters *Crassostrea gigas*. Dis. Aquat. Organ. 67, 141–147.
- Olicard, C., Renault, T., Torhy, C., Benmansour, A., Bourgougnon, N., 2005b. Putative antiviral activity in hemolymph from adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Antiviral Res. 66, 147–152.
- Paillard, C., Le Roux, F., Borrego, J.J., 2004. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: trends and evolution. Aquat. Living Resour. 17, 477–498.
- Pallavicini, A., del Mar Costa, M., Gestal, C., Dreos, R., Figueras, A., Venier, P., Novoa, B., 2008. High sequence variability of myticin transcripts in hemocytes of immune-stimulated mussels suggests ancient host–pathogen interactions. Dev. Comp. Immunol. 32, 213–226. doi:10.1016/j.dci.2007.05.008
- Paul-Pont, I., Dhand, N.K., Whittington, R.J., 2013. Spatial distribution of mortality in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: reflection on mechanisms of OsHV-1 transmission. Dis. Aquat. Organ. 105, 127–138. doi:10.3354/dao02615
- Pepin, J.F., Riou, A., Renault, T., 2008. Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. J. Virol. Methods 149, 269–276.
- Perng, G.-C., Jones, C., Ciacchi-Zanella, J., Stone, M., Henderson, G., Yukht, A., Slanina, S.M., Hofman, F.M., Ghiasi, H., Nesburn, A.B., Wechsler, S.L., 2000. Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. Science 287, 1500–1503. doi:10.1126/science.287.5457.1500
- Petton, B., Pernet, F., Robert, R., Boudry, P., 2013. Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. Aquac. Environ. Interact. 3, 257–273. doi:10.3354/aei00070
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 29, e45.
- Philipp, E.E.R., Kraemer, L., Melzner, F., Poustka, A.J., Thieme, S., Findeisen, U., Schreiber, S., Rosenstiel, P., 2012. Massively Parallel RNA Sequencing Identifies a Complex Immune Gene Repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*. PLoS ONE 7, e33091. doi:10.1371/journal.pone.0033091
- Plumb, J.A., 1973. Effects of Temperature on Mortality of Fingerling Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Experimentally Infected with Channel Catfish Virus. J. Fish. Res. Board Can. 30, 568–570. doi:10.1139/f73-099

- Preston, C.M., 2000. Repression of viral transcription during herpes simplex virus latency. *J. Gen. Virol.* 81, 1–19.
- Randall, R.E., Goodbourn, S., 2008. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 89, 1–47. doi:10.1099/vir.0.83391-0
- Rémillard-Labrosse, G., 2010. Étude de la sortie du virus herpès simplex de type 1 (HSV 1) hors du noyau.
- Renault, T., Bouquet, A.L., Maurice, J.-T., Lupo, C., Blachier, P., 2014. Ostreid herpesvirus 1 infection among Pacific oysters, *Crassostrea giga*, spat: virus replication and circulation related to water temperature prior the onset of mortality. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.00484–14. doi:10.1128/AEM.00484-14
- Renault, T., Moreau, P., Faury, N., Pepin, J.-F., Segarra, A., Webb, S., 2012. Analysis of Clinical Ostreid Herpesvirus 1 (*Malacoherpesviridae*) Specimens by Sequencing Amplified Fragments from Three Virus Genome Areas. *J. Virol.* 86, 5942–5947. doi:10.1128/JVI.06534-11
- Renault, T., Faury, N., Barbosa-Solomieu, V., Moreau, K., 2011. Suppression subtractive hybridisation (SSH) and real time PCR reveal differential gene expression in the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, challenged with Ostreid herpesvirus 1. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 725–735.
- Renault, T., 2010. Maîtriser les maladies infectieuses pour une aquaculture durable: Les maladies infectieuses chez les mollusques, un risque à maîtriser pour une aquaculture durable.
- Renault, T., 2007. Tenter de maîtriser les maladies infectieuses chez les mollusques : une clé pour une aquaculture durable.
- Renault, T., 2006. Viruses of bivalve shellfish, in: *Annales de l'Institut Pasteur. Virologie.* pp. 35–41.
- Renault, T., Novoa, B., 2004. Viruses infecting bivalve molluscs. *Aquat. Living Resour.* 17, 397–409. doi:10.1051/alr:2004049
- Renault, T., Le Deuff, R.M., Chollet, B., Cochenne, N., Gérard, A., 2000a. Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Dis. Aquat. Organ.* 42, 173–183. doi:10.3354/dao042173
- Renault, T., Le Deuff, R.-M., Lipart, C., Delsert, C., 2000b. Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *J. Virol. Methods* 88, 41–50. doi:10.1016/S0166-0934(00)00175-0
- Renault, T., Stokes, N., Chollet, B., Cochenne, N., Berthe, F., Gerard, A., Burrenson, E., 2000c. Haplosporidiosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. *Dis. Aquat. Organ.* 42, 207–214.
- Renault, T., Lipart, C., 1998. Diagnosis of herpes-like virus infections in oysters using molecular techniques. Presented at the Aquaculture and water : fish culture, shellfish culture and water usage.
- Renault, T., Le Deuff, R.-M., Lipart, C., Chollet, B., Haffner, P., 1997. Programme Herpèsvirus. Synthèse des travaux réalisés au Laboratoire IFREMER de La Tremblade - Mars 1996 - Février 1997.
- Renault, T., Cochenne, N., Le Deuff, R.-M., Chollet, B., 1994a. Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 14, 64–66.
- Renault, T., Le Deuff, R.-M., Cochenne, N., Maffart, P., 1994b. Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France-Comparative study. *Rev. Médicale Vét.* 145, 735–742.

- Ren, W., Chen, H., Renault, T., Cai, Y., Bai, C., Wang, C., Huang, J., 2013. Complete genome sequence of acute viral necrosis virus associated with massive mortality outbreaks in the Chinese scallop, *Chlamys farreri*. *Virol. J.* 10, 110. doi:10.1186/1743-422X-10-110
- Robalino, J., Bartlett, T., Shepard, E., Prior, S., Jaramillo, G., Scura, E., Chapman, R.W., Gross, P.S., Browdy, C.L., Warr, G.W., 2005. Double-Stranded RNA Induces Sequence-Specific Antiviral Silencing in Addition to Nonspecific Immunity in a Marine Shrimp: Convergence of RNA Interference and Innate Immunity in the Invertebrate Antiviral Response? *J. Virol.* 79, 13561–13571. doi:10.1128/JVI.79.21.13561-13571.2005
- Robalino, J., Browdy, C.L., Prior, S., Metz, A., Parnell, P., Gross, P., Warr, G., 2004. Induction of Antiviral Immunity by Double-Stranded RNA in a Marine Invertebrate. *J. Virol.* 78, 10442–10448. doi:10.1128/JVI.78.19.10442-10448.2004
- Roch, P., 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172, 125–145.
- Roizman and Batterson, 1985, Herpesviruses and their replication B.N. Fields (Ed.), Virology, Raven Press, New York, pp. 497–526
- Roizman, B., Baines, J., 1991. The diversity and unity of herpesviridae. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 14, 63–79. doi:10.1016/0147-9571(91)90122-T
- Roizman, B., Pellett, P.E., 2001. The family Herpesviridae: a brief introduction. *Fields Virol.* 2, 2381–2397.
- Rowley, A.F., Powell, A., 2007. Invertebrate Immune Systems—Specific, Quasi-Specific, or Nonspecific? *J. Immunol.* 179, 7209–7214. doi:10.4049/jimmunol.179.11.7209
- Samain, J.F., Dégremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., Moal, J., Huvet, A., Bacca, H., Van Wormhoudt, A., Delaporte, M., Costil, K., Pouvreau, S., Lambert, C., Boulo, V., Soudant, P., Nicolas, J.L., Le Roux, F., Renault, T., Gagnaire, B., Geret, F., Boutet, I., Burgeot, T., Boudry, P., 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* 268, 227–243. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.044
- Samain, J.-F., McCombie, H., 2008. Summer Mortality of Pacific Oyster *Crassostrea Gigas*: The Morest Project. Editions Quae.
- Saulnier, D., De Decker, S., Haffner, P., 2009. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: A useful tool for epidemiologic studies. *J. Microbiol. Methods* 77, 191–197.
- Sauvage, C., Boudry, P., de Koning, D.-J., Haley, C.S., Heurtebise, S., Lapègue, S., 2010. QTL for resistance to summer mortality and OsHV-1 load in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Anim. Genet.* 41, 390–399. doi:10.1111/j.1365-2052.2009.02018.x
- Sauvage, C., Pépin, J.F. o., Lapègue, S., Boudry, P., Renault, T., 2009. Ostreid herpes virus 1 infection in families of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during a summer mortality outbreak: Differences in viral DNA detection and quantification using real-time PCR. *Virus Res.* 142, 181–187.
- Savin, K.W., Cocks, B.G., Wong, F., Sawbridge, T., Cogan, N., Savage, D., Warner, S., 2010. A neurotropic herpesvirus infecting the gastropod, abalone, shares ancestry with oyster herpesvirus and a herpesvirus associated with the amphioxus genome. *Virol. J.* 7, 308. doi:10.1186/1743-422X-7-308
- Schaefer, T.M., Fahey, J.V., Wright, J.A., Wira, C.R., 2005. Innate Immunity in the Human Female Reproductive Tract: Antiviral Response of Uterine Epithelial Cells to the

- TLR3 Agonist Poly(I:C). J. Immunol. 174, 992–1002. doi:10.4049/jimmunol.174.2.992
- Schikorski, D., Faury, N., Pepin, J.F., Saulnier, D., Tourbiez, D., Renault, T., 2011. Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Res.* 155, 28–34.
- Schikorski, D., Faury, N., Pepin, J.F., Saulnier, D., Tourbiez, D., Renault, T., 2011a. Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Res.* 155, 28–34. doi:10.1016/j.virusres.2010.07.031
- Schikorski D., Renault, T., Saulnier, D., Faury, N., Moreau, P., Pépin, J.-F., 2011b. Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. *Vet. Res.* 42, 27. doi:10.1186/1297-9716-42-27
- Scotti, P.D., Dearing, S.C., Greenwood, D.R., 2007. Characterisation of cavortin, the major haemolymph protein of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 41, 91–101. doi:10.1080/00288330709509898
- Segarra, A., Faury, N., Pépin, J.-F., Renault, T., 2014a. Transcriptomic study of 39 ostreid herpesvirus 1 genes during an experimental infection. *J. Invertebr. Pathol.* 119C, 5–11. doi:10.1016/j.jip.2014.03.002
- Segarra, A., Mauduit, F., Faury, N., Trancart, S., Dégremont, L., Tourbiez, D., Haffner, P., Barbosa-Solomieu, V., Pépin, J.-F., Travers, M.-A., Renault, T., 2014b. Dual transcriptomics of virus-host interactions: comparing two Pacific oyster families presenting contrasted susceptibility to ostreid herpesvirus 1. *BMC Genomics* 15, 580. doi:10.1186/1471-2164-15-580
- Segarra, A., Pépin, J.F., Arzul, I., Morga, B., Faury, N., Renault, T., 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res.* 153, 92–99. doi:10.1016/j.virusres.2010.07.011
- Seto, A., Nagano, Y., Isono, T., Kurokawa, M., 1997. Resistance to herpes simplex virus type 1 and its latent infection of human T cell lymphotropic virus type I-transformed T cell lines of rabbits. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 11), 2901–2907.
- Shimizu, T., Yoshida, N., Kasai, H., Yoshimizu, M., 2006. Survival of Koi Herpesvirus (KHV) in Environmental Water. *Fish Pathol.* 41, 153–157. doi:10.3147/jsfp.41.153
- Sindermann, C.J., 1990. *Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish: Diseases of Marine Fishes*. Gulf Professional Publishing.
- Sire, C., Rognon, A., Theron, A., 1998. Failure of *Schistosoma mansoni* to reinfect *Biomphalaria glabrata* snails: acquired humoral resistance or intra-specific larval antagonism? *Parasitology* 117 (Pt 2), 117–122.
- Smolowitz, R., Leavitt, D., Perkins, F., 1998. Observations of a Protistan Disease Similar to QPX in *Mercenaria mercenaria* (Hard Clams) from the Coast of Massachusetts. *J. Invertebr. Pathol.* 71, 9–25. doi:10.1006/jipa.1997.4706
- Snieszko, S.F., 1974. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes*. *J. Fish Biol.* 6, 197–208. doi:10.1111/j.1095-8649.1974.tb04537.x
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 23–28.
- Soletchnik, P., Ropert, M., Mazurié, J., Gildas Fleury, P., Le Coz, F., 2007. Relationships between oyster mortality patterns and environmental data from monitoring databases along the coasts of France. *Aquaculture* 271, 384–400. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.02.049

- Stachowski-Haberkorn, S., 2008. Méthodes d'évaluation de l'impact de pesticides sur le phytoplancton marin et le naissain d'huître creuse. Université de Bretagne occidentale - Brest.
- Stackpole, C.W., 1969. Herpes-type virus of the frog renal adenocarcinoma. I. Virus development in tumor transplants maintained at low temperature. *J. Virol.* 4, 75–93.
- Strnad, B.C., Aurelian, L., 1976. Proteins of herpesvirus type 2: I. Virion, nonvirion, and antigenic polypeptides in infected cells. *Virology* 69, 438–452. doi:10.1016/0042-6822(76)90475-X
- Tidbury, H.J., Pedersen, A.B., Boots, M., 2011. Within and transgenerational immune priming in an insect to a DNA virus. *Proc. Biol. Sci.* 278, 871–876. doi:10.1098/rspb.2010.1517
- Timmons, L., Fire, A., 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395, 854. doi:10.1038/27579
- Travers, M.-A., Mersni Achour, R., Haffner, P., Tourbiez, D., Cassone, A.-L., Morga, B., Doghri, I., Garcia, C., Renault, T., Fruitier-Arnaudin, I., Saulnier, D., 2014. First description of French *V. tubiashii* strains pathogenic to mollusk: I. Characterization of isolates and detection during mortality events. *J. Invertebr. Pathol.* doi:10.1016/j.jip.2014.04.009
- Vásquez-Yeomans, R., García-Ortega, M., Cáceres-Martínez, J., 2010. Gill erosion and herpesvirus in *Crassostrea gigas* cultured in Baja California, Mexico. *Dis. Aquat. Organ.* 89, 137–144. doi:10.3354/dao02189
- Vigneron, V., Sollicie, 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. doi:10.3354/dao062035
- Walton, A., Montanie, H., Arcier, J.M., Smith, V.J., Bonami, J.R., 1999. Construction of a gene probe for detection of P virus (*Reoviridae*) in a marine decapod. *J. Virol. Methods* 81, 183–192.
- Wang, H.-W., Sharp, T.V., Koumi, A., Koentges, G., Boshoff, C., 2002. Characterization of an anti-apoptotic glycoprotein encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus which resembles a spliced variant of human survivin. *EMBO J.* 21, 2602–2615. doi:10.1093/emboj/21.11.2602
- Wang, M., Yang, J., Zhou, Z., Qiu, L., Wang, L., Zhang, H., Gao, Y., Wang, X., Zhang, L., Zhao, J., Song, L., 2011. A primitive Toll-like receptor signaling pathway in mollusk Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 511–520. doi:10.1016/j.dci.2010.12.005
- Webb, S.C., Fidler, A., Renault, T., 2007. Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1 (OsHV-1): Application in a survey of New Zealand molluscs. *Aquaculture* 272, 126–139. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.07.224
- Welch, H.M., Bridges, C.G., Lyon, A.M., Griffiths, L., Edington, N., 1992. Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. *J. Gen. Virol.* 73 (Pt 2), 261–268.
- Wilcox, C.L., Smith, R.L., Everett, R.D., Mysowski, D., 1997. The herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 is necessary for the efficient establishment of latent infection. *J. Virol.* 71, 6777–6785.
- Wise, J.A., Harrell, S.F., Busch, R.L., Boyle, J.A., 1988. Vertical transmission of channel catfish virus. *Am. J. Vet. Res.* 49, 1506–1509.
- Xue, Q., Renault, T., 2000. Enzymatic Activities in European Flat Oyster, *Ostrea edulis*, and Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*, Hemolymph. *J. Invertebr. Pathol.* 76, 155–163. doi:10.1006/jipa.2000.4965

- Xue, Q., Renault, T., 2001. Monoclonal antibodies to European flat oyster *Ostrea edulis* hemocytes: characterization and tissue distribution of granulocytes in adult and developing animals. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 187–194.
- Xu, F., Wang, X., Feng, Y., Huang, W., Wang, W., Li, L., Fang, X., Que, H., Zhang, G., 2014. Identification of Conserved and Novel MicroRNAs in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* by Deep Sequencing. *PloS One* 9, e104371. doi:10.1371/journal.pone.0104371
- You, Y., Huan, P., Liu, B., 2012. RNAi assay in primary cells: a new method for gene function analysis in marine bivalve. *Mol. Biol. Rep.* 39, 8209–8216. doi:10.1007/s11033-012-1668-y
- Zeng, M., Cui, W., Zhao, Y., Liu, Z., Dong, S., Guo, Y., 2008. Antiviral active peptide from oyster. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 26, 307–312. doi:10.1007/s00343-008-0307-x
- Zhang, D., Jiang, S., Qiu, L., Su, T., Wu, K., Li, Y., Zhu, C., Xu, X., 2009. Molecular characterization and expression analysis of the IκB gene from pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 84–90. doi:10.1016/j.fsi.2008.10.009
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P.W.H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Lošo, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Wang, J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, S., Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, J., Wang, Q., Steinberg, C.E.W., Wang, H., Li, N., Qian, L., Zhang, G., Li, Y., Yang, H., Liu, X., Wang, J., Yin, Y., Wang, J., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490, 49–54. doi:10.1038/nature11413
- Zhang, T., Qiu, L., Sun, Z., Wang, L., Zhou, Z., Liu, R., Yue, F., Sun, R., Song, L., 2014. The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Dev. Comp. Immunol.* 45, 141–150. doi:10.1016/j.dci.2014.02.015
- Zhang, Y., He, X., Yu, Z., 2011. Two homologues of inhibitor of NF-kappa B (IκB) are involved in the immune defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 1354–1361. doi:10.1016/j.fsi.2011.03.008
- Zhou, Z., Wang, L., Song, L., Liu, R., Zhang, H., Huang, M., Chen, H., 2014. The Identification and Characteristics of Immune-Related MicroRNAs in Haemocytes of Oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS ONE* 9, e88397. doi:10.1371/journal.pone.0088397

ANNEXES

ANNEXE 1 : DETECTION AND DESCRIPTION OF A PARTICULAR OSTREID HERPESVIRUS 1 GENOTYPE ASSOCIATED WITH MASSIVE MORTALITY OUTBREAKS OF PACIFIC OYSTERS, *CRASSOSTREA GIGAS*, IN FRANCE IN 2008.

Virus Research

October 2010, Volume 153, Issue 1, Pages 92-99

<http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.011>

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

Archimer

<http://archimer.ifremer.fr>

Detection and description of a particular *Ostreid herpesvirus 1* genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008

Amélie Segarra^a, Jean François Pépin^{a,*}, Isabelle Arzul^a, Benjamin Morga^a, Nicole Faury^a and Tristan Renault^a

^a Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP), Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France

*: Corresponding author : Jean François Pépin, Tel.: +33 5 46 76 26 48; fax: +33 5 46 76 26 11, email address : jfpepin@ifremer.fr

Abstract:

Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) infections have been reported around the world and are associated with high mortalities of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). In the summer 2008, abnormal mortality rates ranging from 80% to 100% were reported in France and affected only Pacific oysters. Analyses of oyster samples collected during mortality outbreaks demonstrated a significant detection of OsHV-1 (75% of analysed batches), which appeared stronger than previous years. DNA sequencing based on C and IA regions was carried out on 28 batches of OsHV-1 infected Pacific oysters collected in 2008. Polymorphisms were described in both the C and IA regions and characterized a genotype of OsHV-1 not already reported and termed OsHV-1 μ Var. A microsatellite zone present in the C region showed several deletions. Additionally, 44 isolates collected in France and in the USA, from 1995 to 2007 were sequenced and compared to the 2008 sequences. The analyses of 76 sequences showed OsHV-1 μ Var detection only in 2008 isolates. These data suggest that OsHV-1 μ Var can be assumed as an emergent genotype.

Keywords: Herpes virus; Oyster; *Crassostrea gigas*; OsHV-1 μ Var; Increased mortality; Microsatellites

1. Introduction

Since 1993 high mortalities of spat and juveniles of *Crassostrea gigas* (Thunberg) are regularly observed in batches of Pacific oyster cultured in different French locations occurring each year during summer period in association with a herpes-like virus (Renault et al., 1994; Renault et al., 2000a, 2000b). A similar virus was also reported in the USA during mortality outbreaks (Burge et al. 2006, Burge et al., 2007). Despite these findings, the aetiology of summer mortalities seems to be multifactorial, arising as a result of complex interactions between the physiological status of the host, the environment and pathogens such as bacteria of the genus *Vibrio* and/or a herpes virus (Samain and McCombie, 2008, Sauvage et al., 2009).

The repeated mortalities associated with herpesviruses in bivalves, particularly in *C. gigas*, and the economic importance of *C. gigas* as an aquaculture product lead to sequencing and characterization of the Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) (Davison et al. 2005) in the Family *Herpesviridae*. Recently, OsHV-1 was included in the re-classification of the Order *Herpesvirales* as the lone member of the Family *Malacoherpesviridae* (Davison et al. 2009). Molecular tools based on OsHV-1, including conventional Polymerase Chain Reaction (cPCR), *in situ* hybridization, and quantitative PCR have been developed to study OsHV-1 infections (Renault and Lipart, 1998; Renault et al., 2000b; Arzul et al., 2002; Lipart and Renault, 2002; Pépin et al., 2008). These tools allow rapid identification and/or confirmation of OsHV-1 in animals presenting unusual mortalities. cPCR followed by sequencing of PCR products also allowed the description of possible OsHV-1 variants (Arzul et al., 2001a; Friedman et al., 2005; Moss et al., 2007). A variant, named OsHV-1var (Arzul et al., 2001a) was associated with mortalities of bivalves including *Ruditapes philippinarum* (Arzul et al., 2001a), *Crassostrea gigas* and *Pecten maximus* (Arzul et al., 2001b) in French hatcheries. Although the variant genotype presents several modifications in the C region and more importantly, a 2.8 kpb deletion, OsHV-1 and OsHV-1var are considered representative of a single viral species (Arzul et al., 2001a).

In the summer of 2008, widespread mortalities were reported in French stocks of *C. gigas* grown in all production areas and killed billions young oysters. Outbreaks were first observed in April/May. Mortality outbreaks were usually sudden and affected principally spat (oysters less than 1-year old) and juveniles (12-18-month-old oysters). Mortality rates of 40 to 100% were experienced. The Pacific oyster appears to be the only shellfish species affected by these mortalities. Samples were collected from all affected locations and tested in order to search pathogens. Different diagnostic tests were carried out and results indicated that (1) there was no officially notifiable pathogen involved, (2) OsHV-1 was detected in most of samples especially in moribund oysters, (3) *V. splendidus*, *V. aestuarianus* and *Vibrio. harveyi* were also detected in affected oysters and (4) viral particles looking like herpes viruses were observed by TEM in moribund tested oysters. Among batches affected by mortality and analysed for pathogens detection 75% were positive for OsHV-1. (Anon., 2008; Pernet et al., 2010). Because of the exceptional mortality level associated with an abnormally high frequency of detection of OsHV-1 in all livestock, the average detection rate increased by at least 30% according to data monitoring from 1997 - 2005 (Celine Garcia, personal communication), a increased need has emerged to better characterize isolates of herpes viruses found in infected batches.

Investigations were conducted in order to identify additional factors including emerging strains of known pathogens (i.e. emerging OsHV-1 genotype). The aim of the present study was to determine if OsHV-1 detected in *C. gigas* during the 2008 abnormal mortalities was similar to the characterized OsHV-1 reference genotype (GenBank accession number AY509253: virus isolate from Pacific oyster larvae in 1995). OsHV-1 detection was performed by PCR (Renault and Arzul, 2001) followed by restriction endonuclease digestion of PCR products and DNA sequencing in order to study virus polymorphism into ORF4 and ORF43.

2. Material and methods

2.1 Sample selection

Twenty-eight batches representing thirty-two isolates of DNA extracted from *C. gigas* spat or juvenile oysters were selected among the samples collected by the French network for surveillance of mollusc diseases (Repamo, Ifremer) during 2008 mortality events (Table 1). Batches were selected for analysis based on high mortality rates (>70%) and their geographic origins (Normandy, north Brittany, south Brittany, Vendée, Charente-Maritime, Arcachon and Thau lagoon). Selected batches were also representative of type practices, hatchery produced or wild captured spat oysters. In addition, analyses were also performed retrospectively on archived samples collected between 1995 and 2007 in France and in the USA (Table 2). These 44 isolates were selected not because of their locations but because they were associated with mortality events in oysters that occurred before the French mass mortality from 2008. The aim of testing this samples old collection was to look for the potential occurrence of the newly described genotype OshV-1 μ Var herein.

Nucleic acid extraction. Samples from oysters were processed for nucleic acid extraction using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol.

2.2 PCR conditions

OshV-1 specific PCR analyses were performed using three primer pairs targeting two different regions of the OshV-1 genome: IA (ORF43) and C (ORF4). Region IA encodes a putative apoptosis inhibitor (I. Arzul, unpublished data) and region C encodes two proteins of unknown function (Renault and Arzul, 2001). The first primer pair was designed from herpes viral sequences (Davison et al. 2005; I. Arzul, unpublished data), IA1/IA2 amplified a 607 bp fragment (Table 3). The second primer pair, C2/C6 amplified a 709 bp fragment (Renault and Arzul, 2001) (Table 3). The primers were synthesized and supplied by Eurogentec (Belgium). PCR analysis was carried out as previously described (Renault and Arzul, 2001). Briefly, one round PCR was carried out in a final reaction volume of 50 μ l. Each reaction volume contained 2.5 U of Taq Goldstar Polymerase (Eurogentec, Belgium), 10x reaction buffer (Eurogentec, Belgium), 2.5 mM MgCl₂, 0.05 mM of each dNTP, 10 μ M of each primer. DNA was added under a volume of 1 μ l. After heating DNA samples for 2 min at 94°C, 35 cycles were carried out followed by a final elongation step of 5 min at 72°C. Each of the 35 cycles consisted of a DNA melting step at 94°C for 1 min, a primer annealing step for 1 min at 50°C and a primer elongation step at 72°C for 1 min. Negative controls consisted of 1 μ l of distilled water. Two nanogram of genomic virus DNA extracted from purified particles (Le Deuff and Renault, 1999) was added as positive control. PCR products was size selected on 1.5% agarose gels, stained with ethidium bromide (5 μ l/100ml) and visualized using a 302-nm UV transilluminator.

2.3 Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis

The PCR products were digested with 10 U of restriction endonucleases during 2 hours in a final reaction volume of 20 μ l at 37°C with XhoI and StyI on C2-C6 PCR products, at 37°C with MspI and at 60°C with TaqI on IA1-IA2 PCR products. Digested products were size selected on 2% agarose gels. Restriction maps of the reference digested PCR products when the C2/C6 and IA1/IA2 primer sets were used are shown in Table 4 (Arzul et al., 2001a; I. Arzul, unpublished data). Positive control consisted of purified viral DNA. Negative control was formed by distilled water.

2.4 PCR products purification

PCR products were purified using Montage® Centrifugal Filter Devices according to the Millipore Kit. Fresh purified products were analysed on 1.5% agarose gels with DNA ladder corresponding to the expected fragments. The picture of the gel was analysed with Quantity One Software in order to calculate the concentration of samples before sequencing.

2.5 Direct nucleotide sequencing

The sequencing reaction was carried out into a 10 µl final volume, containing 1.8 µl of sequencing buffer, 0.4 µl of BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems), 1.5 µl of primer Forward or Reverse at 4µM (primers are the same used for the classical one round PCR Table 3), fresh purified PCR products and DNase and RNase free sterile water qsp to 10µl. The programme consisted in an initial denaturation of 3 minutes at 96°C followed by 35 cycles of 30 s at 96°C, 30s at 50°C and 4 minutes at 60°C. Reactions were performed using 96-well plates. Sequencing reactions were then purified as follows. In each sample, 60 µl of 100% ethanol were added and samples were centrifuged at 3000 x g for 30 minutes. The plate was inverted to remove ethanol. Then, 60 µl 70% ethanol were added, followed by centrifugation of plates at 1650 x g for 10 minutes. The plate was then centrifuged upside down for 30s to remove the ethanol. Finally, samples were dried in a Speed Vac and resuspended with 10 µl formamide. Samples were loaded in ABI PRISM® 3130 XL-Avant Genetic Analyzer, using a 36 cm capillary array and POP 7 polymer.

2.6 Sequence alignment

Sequence base pairs were called with Chromas lite 2.01 version software. Multiple alignments were achieved by Bioedit 7.0.9 version software using the algorithm CLUSTAL W. Sequence results were compared to the consensus sequence OsHV-1 available on GENBANK (accession number AY509253). PCR products from all isolates of 2008 and previous years were sequenced twice on order to confirm results. Expected protein sequences were compared by translating the nucleotide sequences to amino acid sequences.

3. Results

3.1 PCR

A preliminary study was performed using PCR primers targeting different regions of the genome as Gp (ORF88), IA (ORF43) and C (ORF4) using four isolates. As a larger percentage of polymorphisms was observed using C (ORF4) and IA (ORF43) than Gp (ORF88), the C and IA regions were chosen for further PCR analyses. Twenty-eight batches of Pacific oysters collected in 2008 representing 6 geographic regions, were analysed by PCR using the primer pairs IA1/IA2 and C2/C6. PCR analysis with the IA1/IA2 and C2/C6 primers resulted in amplicons of expected size for the 28 batches, 607 bp and 709 bp, respectively. After gel analysis no difference was observed between samples and positive controls (Fig. 1). No PCR product was detected in negative controls.

3.2 RFLP analysis

The IA1/IA2 and C2/C6 PCR products were digested using 4 restriction enzymes. IA products digested by *TaqI* and *MspI* displayed an equal restriction profiles for the 28 batches compared to the restriction profile of the reference OshV-1 isolate (Fig. 2). Similar results were observed for C2/C6 PCR products digested by *XhoI* and *StyI* (Fig. 3). Gel analysis displayed no difference between samples and positive reference controls.

3.3 Sequence analysis

The IA1/IA2 and C2/C6 PCR products were sequenced from 32 isolates in 2008. Using the C2/C6 primers, 17 isolates were identical to the OshV-1 reference isolate, while 15 showed sequence variations. These 15 isolates were identical to each other. Polymorphisms included a single addition, several substitutions and deletions. (Fig. 4). The main deletion consisted of 12 consecutive nucleic acids in a repeated region of trinucleotides characterized by a "CTA" pattern, followed by one deletion of "one Adenine (A)". This microsatellite present in the reference OshV-1 isolate is formed of 24 bp. This motif is located in the interval 4487-4510 (nucleotide position in total genome) but also in the interval 178547-178570 because C region is a inverted repeat. The "CTA" pattern is repeated 4 times in these 15 isolates whereas it is repeated 8 times in the reference OshV-1 isolate (Fig. 4). Two non-synonymous substitutions were else reported in the coding zone of the C region. The genotype of OshV-1 presenting these modifications has been called OshV-1 μ Var in order to differentiate it with already described genotypes OshV-1 and OshV-1 var (Fig.4).

Sequences obtained with the primer pair IA1/IA2 further discriminated two groups among the 32 analysed isolates: a first group of 17 isolates were identical to each other and 100% identical to the OshV-1 reference sequence (data not shown). The second group constituted of 15 isolates presenting differences compared to the OshV-1 reference isolate. For OshV-1 μ Var sequence, these differences corresponded to the variations of two nucleotides resulting from one deletion of "one Adenine (A)" at position 116 and one substitution of a "Cytosine (C)" replaced by a Tyrosine (T)" at position 526 (Fig.5).

Thirty-two nucleotide sequences from the C and the IA regions were obtained on 2008 isolates: 96% homology between the OshV-1 reference genotype and the OshV-1 μ Var genotype were reported and 99% homology between the OshV-1 reference genotype and the genotype μ Var. 42.8% of 28 analysed batches from 2008 presented the genotype OshV-1 μ Var. In one of the 28 batches, batch 1, both OshV-1 μ Var (isolates 1a, 1b) and OshV-1 reference genotypes (isolate 1c) were both detected (Table 1).

In order to determine if the μ Var genotype was retrospectively detected in archived samples, 44 isolates from oysters collected in 1995, 2003, 2004, 2005, 2006, or 2007 from France and the USA were analysed with PCR using C2/C6 and sequenced as described above. All sequences obtained were identical to each other and 100% identical to the OshV-1 reference isolate.

As there was a greater polymorphism in the sequences of OshV μ Var using the C2/C6 primers compared to IA1/IA2, the 44 isolates were only analysed using the C2/C6 primers.

3.4 Analysis of amino acid sequences

Sequence results using the primer pair IA1/IA2 showed presence of one synonymous substitution (T to C) in the coding region of ORF43. Alignment between the amino acids from the C2/C6 fragment obtained with an isolate belonging to OshV-1 μ Var group and the reference genotype. ORF 4 showed non-synonymous substitutions. The first substitution induced the modification of a GAU codon (D: aspartic acid) to an AAU codon (N: asparagine). The second substitution induced the modification of a GAA codon (E: glutamic

acid) to an AAA codon (K: lysine) (Fig. 6). These amino acid modifications were detected only in the OsHV-1 μ Var isolates.

4. Discussion

Massive mortality outbreaks affecting simultaneously all French oyster producing areas of juvenile Pacific oysters were reported in France in 2008 (Renault et al., 2009). Although causes of mortalities are currently being investigated, one of the most probable causes was identified as a herpes virus infection.

We described herein polymorphisms among some isolates collected during 2008 mortality outbreaks for both targeted virus genes, ORF4 (C region) and ORF43 (IA region). Indeed, 15 isolates presented variability in both C and IA regions. Moreover, all these 15 isolates were identical to each other for both targeted ORF (ORF4 and ORF43). Namely, the 15 isolates showed two non-synonymous substitutions located in the coding region of the ORF 4. It is unknown if these substitutions determine changes in biological properties or protein conformation. On the contrary, the substitution observed in the coding area of the ORF43 is synonymous. The 15 isolates grouped all together on the basis of sequence data and were interpreted as a genomic variant of OsHV-1, termed OsHV-1 μ Var. A genomic variant has already been reported under the name OsHV-1 var (Arzul et al. 2001a). This variant was characterized by a large deletion around 2.8 kbp in C region.

Genetic polymorphisms in vertebrate herpes viruses may be regarded as markers of geographical origins and/or distinct virus phenotypes (Grose et al., 2004; Bowden et al., 2006; Tomsello et al., 2010). Although the glycoprotein gB of HHV-7 (Human herpes virus 7) presented a certain degree of polymorphism depending on geographic origins (Franti et al., 1998), this polymorphism was not related to different virus phenotypes. On the contrary, polymorphism of gB in two other herpes viruses, HCMV (human cytomegalovirus) and HHV-6 (human herpesvirus 6), induce amino acid changes which result in distinct virus phenotypes (Chou and Marousek, 1992). Based on the samples analysed herein, there were no geographical patterns in detection of OsHV-1 μ Var. Both genotypes (reference and μ Var) were detected in all the areas where samples have been collected in 2008, from the Mediterranean coast to Normandy. Moreover, a sample collected in China in 2002, presented the main deletion repeated for OsHV-1 μ Var in the C region. This isolate showed the main deletion consisting of 13 consecutive nucleic acids and all other polymorphisms reported for the μ Var genotype except two non-synonymous substitutions in ORF4 and 100% homology with reference genotype in ORF43 (data not shown).

Although no relationship was detected between geographical locations and virus genotypes, OsHV-1 reference genotype was mainly observed in samples collected in May and June 2008 and OsHV-1 μ Var genotype in July and August 2008 in France. Both OsHV-1 genotypes (reference and μ Var) were detected in association with mortality outbreaks reported in France in 2008. Recently experimental transmission challenges showed that OsHV-1 μ Var induced up to 100% mortality by intra-muscular inoculation in Pacific oyster spat (J-F. Pépin., personal communication.). These results raised the question about the virulence of OsHV-1 μ Var. However, more work is needed to fully investigate possible infectivity and virulence differences between the OsHV-1 reference genotype and the OsHV-1 μ Var genotype. Otherwise, the data collected in France in 2009 during mortality outbreaks on Pacific oyster spat displayed only the genotype OsHV-1 μ Var when OsHV-1 detection was associated with mortality events (OIE, 2009; Repamo, 2009).

The original source of OsHV-1 μ Var remains unknown. Maybe unfavorable meteorological conditions of 2008, aquaculture practices, oysters imports from a continent other could have contributed to the emergence of the genotype OsHV-1 μ Var and numerous animal transfers between several French geographic regions could have contributed to dissemination of this genotype. A similar phenomenon was reported in koi carp infected with the koi herpes virus (KHV), Aoki.T. et al. (2007) hypothesized that intensive culture of common carp and koi carp, combined with large-scale movements of live fish, may have favored transmission of genetically deficient KHV strains of enhanced virulence.

For 15 isolates analysed, C2/C6 sequences present a deletion in a zone, presenting the characteristics of a microsatellite area. Microsatellites are short tandem repeats of 1 to 6 nucleotide motives and are highly polymorphic. As they are often highly variable, microsatellites are extensively used for the construction of linkage maps. This area is defined by 8 repeats of 3 nucleotides "CTA" in the OsHV-1 reference genotype (24 bp) and only 4 repeats in the OsHV-1 μ Var genotype either 12 bp, polymorphisms. That is the first report of a microsatellite polymorphism in OsHV-1. Microsatellites have already been reported in vertebrate herpes virus genomes and have been used to characterize different strains, especially in herpes cytomegalovirus (HCMV) (Davis et al., 1999; Walker et al., 2001; Picone et al., 2005) and more recently in HSV-1 (Deback et al., 2009). Based on the polymorphisms observed in C region of the genome, namely a deletion in a particular microsatellite domain, we developed a PCR assay to distinguish both genotypes, OsHV-1 reference genotype and OsHV-1 μ Var genotype (data not shown).

Moreover, the detection of the two genotypes in some samples collected in 2008 let to suspect the presence of both genotypes in one individual. A study using the cloning technique has been carried out to investigate this aspect but has been inconclusive (data not shown).

Although the infection caused by OsHV-1 is not listed at present as a notifiable disease by the EU legislation (2006/88/EC, Annex IV) nor by the OIE (Aquatic Animal Health Code, 2009), a new EU regulation (Regulation 175/2010) was implemented in March 2010. This regulation lays down measures to be taken in the case of increased mortality in the species *C. gigas* in connection with the detection of OsHV-1 μ Var. When the presence of that virus has been detected, disease control measures should be implemented including the establishment of a containment area and the restriction to the movements out of the containment areas of *C. gigas* oysters.

The complete sequencing of OsHV-1 μ Var would be useful to explore polymorphisms in other regions of the virus. The Gp region, which encodes glycoproteins which is involved in recognition and attachment of the virus to the host cell membrane, may be subjected to many variations (Ericksson et al., 2004).

Conclusion

This article described the presence of a genotype of OsHV-1, termed OsHV-1 μ Var, detected in France in 2008 infecting *C. gigas*. The polymorphism reported in a microsatellite area in OsHV-1 μ Var may be suitable for many applications including strain differentiation and phylogeny studies (Goldstein et al., 1999).

Two *Ostreid herpesvirus 1* genotypes were previously characterized: the OsHV-1 reference genotype and the OsHV-1var genotype. Our work revealed the emergence of a third genotype, OsHV-1 μ Var, associated with abnormal mortalities of *C. gigas* in France. This genotype was identified at least in 40% of collected spat batches in 2008 and in 100% of

collected samples in 2009 (Repamo 2009). The detection of this third genotype since 2008 related to extensive mortality outbreaks among French Pacific oyster spat suggests an emerging disease situation. Epidemiology studies would be carried out additionally during future oyster mortality to confirm the detection of OsHV-1 μ Var.

Acknowledgements

The authors thank, Ifremer LGP team and Repamo team for donation of oyster samples and technical assistance; C. Friedman and K. S. Reece for providing not French OsHV-1 DNA samples tested. We also want to thank an anonymous referee for the helpful input and editorial comments in the review of this paper. We are very grateful to C. Burge who edited the English.

References

- Anonymous 2008. The World Animal Health Information Database Interface (WAHID), World Organisation for Animal Health (OIE). Available at: http://www.oie.int/wahis/public.php?page=event_summary&reportid=7288. Accessed May 6, 2010.
- Aoki, T., Hirono, I., Kurokawa, K., Fukuda, H., Nahary, R., Eldar, A., Davison, A.J., Waltzek T.B., Bercovier, H., Hedrick, R.P., 2007. Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide. *J. Virol.* 81, 5058-5065.
- Arzul, I., Renault, T., Lipart, C., Davison, A.J., 2001a. Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *J. Gen. Virol.* 82, 865-870.
- Arzul, I., Nicolas, J.-L., Davison, A.J., Renault, T., 2001b. French scallops: a new host for Ostreid herpesvirus-1. *Virology* 290, 342-349.
- Arzul, I., Renault, T., Thebault, A., Gérard, A., 2002. Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Research*. 84, 151-160.
- Bowden, R., Sakaoka, H., Ward, R., Donnelly, P., 2006. Patterns of Eurasian HSV-1 molecular diversity and inferences of human migrations. *Infect. Genet. Evol.* 6, 63-74.
- Burge, C.A., Griffin, F.J., Friedman, C.S., 2006. Mortality and herpesvirus infections of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Tomales Bay, California, USA. *Dis. Aquat. Org.* 72, 31-43.
- Burge, C.A., Judah, L.R., Conquest, L.L., Griffin, F.J., Cheney, D.P., Suhrbier, A., Vadopalas, B., Olin, P.G., Renault, T., Friedman, C.S., 2007. Summer seed: the influence of oyster stock, planting time, pathogens and environmental stressors. *J. Shellfish Res.* 26, 163-172.
- Chou S, Marousek G I. Homology of the envelope glycoprotein B of human herpesvirus 6 and cytomegalovirus. *Virology*. 1992;191:523–528.
- Davis, C.L., Field, D., Metzgar, D., Saiz, R., Morin, P.A., Smith, I.L., Spector, S.A., Wills, C., 1999. Numerous length polymorphisms at short tandem repeats in human cytomegalovirus. *J. Virol.* 73, 6265-6270.
- Davison, 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.
- Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellet, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., Thiry, E., 2009. The order Herpesvirales. *Archives of Virology* 154, 171-177.

- Deback, C., Boutolleau, D., Depienne, C., Luyt, C.E., Bonnafous, P., Gautheret, A., Garrigue, I., Agut H., 2009. Utilization of Microsatellite Polymorphism for Differentiating Herpes Simplex Virus Type 1 Strains. *J. Clin. Microbiol.* 47, 533-540
- Eriksson, K., Bellner, L., Gorander, S., Lowhagen, G-B., Tunback, P., Rydberg, K., Liljeqvist, J-A., 2004. CD4+ T-cell responses to herpes simplex virus type 2 (HSV-2) glycoprotein G are type specific and differ in symptomatic and asymptomatic HSV-2-infected individuals. *J. Gen. Virol.* 85, 2139-2147.
- Franti, M., Aubin, J.T., Poirel, L., Gautheret-Dejean, A., Candotti, D., Huraux, J.M., Agut, H., 1998. Definition and distribution analysis of glycoprotein B gene alleles of human herpesvirus 7. *J. Virol.* 72, 8725-8730.
- Friedman, C.S., Estes, R.M., Stokes, N.A., Burge, C.A., Hargrove, J.S., Barber, B.J., Elston, R.A., Burrenson, E.M., Reece, K.S., 2005. Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Dis. Aquat. Org.* 63, 33-41.
- Goldstein, D.B., Roemer, G.W., Smith, D.A., Reich, D.E., Bergman, A., Wayne R.K., 1999. The use of microsatellite variation to infer population structure and demographic history in a natural model system. *Genetics.* 151, 797-801.
- Grose, C., Tyler, S., Peters G., Hiebert, J., Stephens, G-M., Ruyechan, W-T., Jackson, W., Storlie J., Tipples, G., 2004. Complete DNA sequence analyses of the first two Varicella-Zoster virus Glycoprotein E (D150N) mutant viruses found in north America: Evolution of genotypes with an accelerated cell spread phenotype. *J. Virol.* 78, 6799-6807
- Le Deuff, R.M. and Renault, T., 1999. Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Gen. Virol.* 80, 1317-1322.
- Lipart, C. and Renault, T., 2002. Herpes-like virus detection in infected *Crassostrea gigas* spat using DIG-labelled probes. *J. Virol. Methods.* 101, 1-10.
- Moss, J.A., Burrenson E.M., Cordes, J.F., Cungan, C.F., Brown, G.D., Wang, A., Wu, X., Reece, K.S., 2007. Pathogens in *Crassostrea ariakensis* and other Asian oyster species: implications for non-native oyster introduction in Chesapeake Bay. *Dis. Aquat. Org.* 77, 207-233.
- OIE, 2009. Suspected herpesvirus OsHV-1 frequently associated with *Vibrio splendidus*, France. http://www.oie.int/wahis/reports/en_imm_0000008265_20090727_142743.pdf. Accessed May 6 2010.
- Pépin, J-F., Riou, A., Renault, T., 2008. Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by realtime PCR. *J. Virol. Methods.* 149, 269-276.
- Pemet, F., Barret, J., Marty, C., Moal, J., Le Gall, P., Boudry, P., 2010. Environmental anomalies, energetic reserves and fatty acid modifications in oysters coincide with an exceptional mortality event. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 401, 129-146
- Picone, O., Ville, Y., Costa, J.M., Rouzioux, C. Leruez-Ville, M., 2005. Human cytomegalovirus (HCMV) short tandem repeats analysis in congenital infection. *J. Clin. Virol.* 32, 254-256.
- Renault, T., Le Deuff, R.M., Cochenne, N., Maffart, P., 1994. Herpesvirus associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France comparative study. *Rev. Méd. Vét.* 145, 735-742.
- Renault, T. and Lipart, C., 1998. Diagnosis of herpes-like virus infections in oysters using molecular techniques. *European Aquaculture Society Special Publication* 26, 235-236.
- Renault, T., Le Deuff, R-M., Chollet, B., Cochenne, N., Gerard, A., 2000a. Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Dis. Aquat. Org.* 42, 173-183.
- Renault, T., Le Deuff, R.M., Lipart, C., Delsert, C., 2000b. Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *J. Virol. Methods.* 88, 41-50.

- Renault T, Arzul I (2001) Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe: specific viral DNA detection by PCR. *Journal of Fish Diseases* 24: 161-167.
- Renault T., Allain G., Arzul I., Chollet B., Cobret L., de Decker S., Faury N., Ferrand S., François C., Garcia C., Haffner P., Joly J. P., Michel J., Miossec L., Morga B., Nicolas J. L., Omnes E., Pépin J. F., Robert M., Saulnier D., Schikorski D., Segarra A., Tourbiez D. (2009). Summer mortality outbreaks of French Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in 2008: research and detection of pathogens. In: *Diseases of Fish and Shellfish*, 14th International Conference of the EAAP. Sept. 14-19. Prague, Czech Republic, abstract O-112. p127.
- Repamo, 2009. Bilan 2009 du réseau Repamo. Rapport interne Ifremer.45p. http://wwwz.ifremer.fr/repamo/content/download/75792/522894/file/lf_Rapport_REPAMO_2009.pdf. Accessed July 22 2010.
- Samain, J.F. and McCombie, H., 2008. Summer Mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*, The Morest project. Eds Quae, Versailles, France.
- Sauvage, C., Pepin, J.F., Lapegue, S., Boudry, P. and Renault, T. (2009) Ostreid herpes virus 1 infection in families of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during a summer mortality outbreak: differences in viral DNA detection and quantification using real-time PCR. *Virus Res* 142 (1-2), 181-187.
- Tornesello, M., Biryahwaho, B., Downing, R., Hatzakis, A., Alessi, E., Cusini, M., Ruocco, V., Katongole-Mbidde, E., Loquercio, G., Buonaguro L., 2010. Human herpesvirus type 8 variants circulating in Europe, Africa and North America in classic, endemic and epidemic Kaposi's sarcoma lesions during pre-AIDS and AIDS era. *Virology*. 398, 280-289.
- Walker, A., Petheram, S.J., Ballard, L., Murph, J.R., Demmler, G.J., Bale, J.F.Jr., 2001. Characterization of human cytomegalovirus strains by analysis of short tandem repeat polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2219-26

Tables

Table 1: Sample dates and origins of isolates from *C. gigas* spat or juvenile oyster collected in 2008. NCM: Natural capture Charente-Maritime. NA: natural capture Arcachon. HA: Hatchery A. HB: Hatchery B. HC: Hatchery C. HD: Hatchery D. CM: Charente-Maritime, LR: Languedoc Roussillon, N: Normandy, SB: South Brittany, NB: North Brittany, V: Vendée, A: Arcachon, /: unknown.

Batch	N° isolate	Hatchery	Origin	Date of sampling	Genotype
1	1.a	NCM	CM	June 2008	OsHV-1 μ Var
	1.b	NCM	CM	June 2008	OsHV-1 μ Var
	1.c	NCM	CM	June 2008	OsHV-1 ref.
2	2	HA	LR	June 2008	OsHV-1 ref.
3	3	HD	LR	June 2008	OsHV-1 ref.
4	4	HD	LR	May 2008	OsHV-1 ref.
5	5	HD	LR	May 2008	OsHV-1 ref.
6	6	HD	LR	May 2008	OsHV-1 ref.
7	7	HD	LR	May 2008	OsHV-1 ref.
8	8	HD	LR	May 2008	OsHV-1 ref.
9	9	HB	LR	May 2008	OsHV-1 ref.
10	10	HB	LR	May 2008	OsHV-1 ref.
11	11	HA	LR	May 2008	OsHV-1 ref.
12	12	/	N	June 2008	OsHV-1 μ Var
13	13	HD	LR	July 2008	OsHV-1 μ Var
14	14	NCM	N	July 2008	OsHV-1 μ Var
15	15	HB	CM	July 2008	OsHV-1 μ Var
16	16	HA	CM	June 2008	OsHV-1 μ Var
17	17.a	HB	N	July 2008	OsHV-1 μ Var
	17.b	HB	N	July 2008	OsHV-1 μ Var
18	18	HA	SB	July 2008	OsHV-1 μ Var
19	19.a	HA	SB	July 2008	OsHV-1 μ Var
	19.b	HA	SB	July 2008	OsHV-1 μ Var
20	20	HA	SB	July 2008	OsHV-1 μ Var
21	21	NA	NB	July 2008	OsHV-1 ref.
22	22	HB	CM	June 2008	OsHV-1 ref.
23	23	HD	CM	May 2008	OsHV-1 ref.
24	24	HD	CM	May 2008	OsHV-1 ref.
25	25	HD	CM	May 2008	OsHV-1 ref.
26	26	HB	CM	August 2008	OsHV-1 μ Var
27	27	HC	V	August 2008	OsHV-1 ref.
28	28	NA	A	August 2008	OsHV-1 μ Var

Table 2: Isolates of DNA extract of *C. gigas* spat or juvenile oyster collected in 1995, 2003, 2004, 2005, 2006 or 2007. HC: Hatchery C. HD: Hatchery D. CM: Charente-Maritime. N: Normandy. /: unknown.

Batch	N° isolate	Hatchery	Origin	Date of sampling	Genotype
29	29	/	France	June 2007	OsHV-1 ref.
30	30	/	France	May 2007	OsHV-1 ref.
31	31	/	France	June 2007	OsHV-1 ref.
32	32	/	France	June 2007	OsHV-1 ref.
33	33	/	France	2007	OsHV-1 ref.
34	34.a	/	France	2007	OsHV-1 ref.
	34.b	/	France	2007	OsHV-1 ref.
35	35	/	France	February 2007	OsHV-1 ref.
36	36	HD	CM	2007	OsHV-1 ref.
37	37	HC	N	December 2006	OsHV-1 ref.
38	38	HC	N	October 2005	OsHV-1 ref.
39	39	HC	N	May 2006	OsHV-1 ref.
40	40	HC	N	May 2006	OsHV-1 ref.
41	41	HC	N	June 2006	OsHV-1 ref.
42	42	HC	N	July 2006	OsHV-1 ref.
43	43	HC	N	July 2006	OsHV-1 ref.
44	44	HC	N	July 2006	OsHV-1 ref.
45	45	/	CM	July 2006	OsHV-1 ref.
46	46	HD	CM	July 2006	OsHV-1 ref.
47	47	HD	CM	July 2006	OsHV-1 ref.
48	48	/	France	2005	OsHV-1 ref.
49	49	/	France	2005	OsHV-1 ref.
50	50	/	France	June 2005	OsHV-1 ref.
51	51	/	France	2005	OsHV-1 ref.
52	52	/	France	2005	OsHV-1 ref.
53	53	/	CM	2004	OsHV-1 ref.
54	54	/	CM	May 2004	OsHV-1 ref.
55	55	/	CM	May 2004	OsHV-1 ref.
56	56	/	France	May 2004	OsHV-1 ref.
57	57	/	France	August 2003	OsHV-1 ref.
58	58	/	France	August 2003	OsHV-1 ref.
59	59	/	France	2003	OsHV-1 ref.
60	60	/	France	July 2003	OsHV-1 ref.
61	61	/	France	August 2003	OsHV-1 ref.
62	62	/	France	August 2003	OsHV-1 ref.
63	63	/	France	1995	OsHV-1 ref.
64	64	/	France	1995	OsHV-1 ref.
65	65	/	France	1995	OsHV-1 ref.
66	66	/	France	1995	OsHV-1 ref.
67	68	/	USA California	July 2007	OsHV-1 ref.
68	69	/	USA California	August 2006	OsHV-1 ref.
69	70	/	USA	August 2006	OsHV-1 ref.
70	71	/	USA	July 2004	OsHV-1 ref.
71	72	/	USA Tomales bay	2003	OsHV-1 ref.

Table 3: Primer sequences used in PCR.

Primer name	Sequence 5'-3'	Tm (°C)	Amplicon (bp)
IA1	CGC GGT TCA TAT CCA AAG TT	59.9	607
IA2	AAT CCC CAT GTT TCT TG CTG	59.9	
C2	CTC TTT ACC ATG AAG ATA CCC ACC	60.1	709
C6	GTG CAC GGC TTA CCA TTT TT	60	

Table 4 : Restriction maps of the reference PCR products when the C2/C6 and IA1/IA2 primer sets were used. Fragment sizes were given in bp.

	C2/C6 PCR products	IA1/IA2 PCR products
5. <i>TaqI</i>	/	51/201/356
<i>MspI</i>	/	163/360/85
<i>XhoI</i>	335/374	/
<i>SpyI</i>	258/451	/

Figures

Figure 1: PCR products of isolates electrophoresed on a 1.5% agarose gel using primer pairs (A) IA1/IA2; and (B) C2/C6. 1a-20: example of isolates P: positive control (OsHV-1 DNA). N: negative control (distilled water). : size of PCR products in bp. M: Small Marker (Eurogentec).

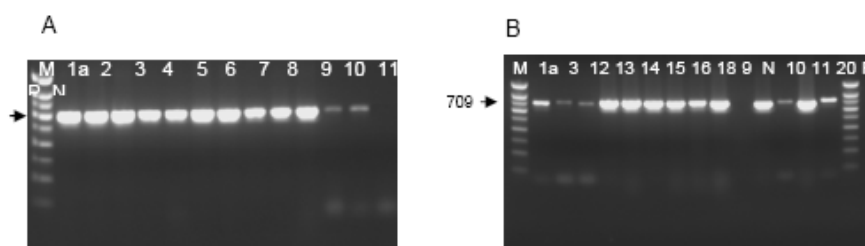


Figure 2: Restriction profiles obtained after digestion of PCR products IA1/IA2 by (A) *TaqI* and (B) *MspI*. 1a-11: example of isolates. P: reference DNA. N: negative control. : size of PCR products in bp. M: Small marker of size, (agarose gel 2%).

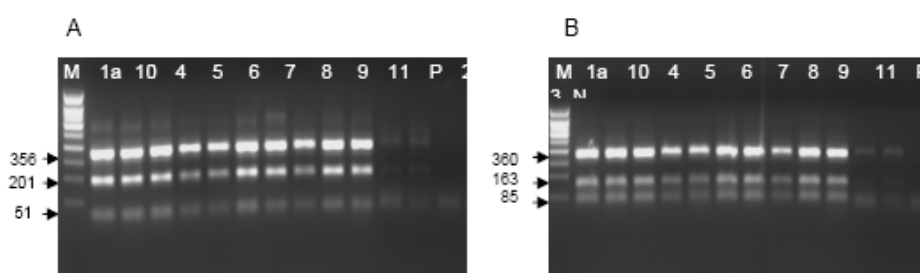
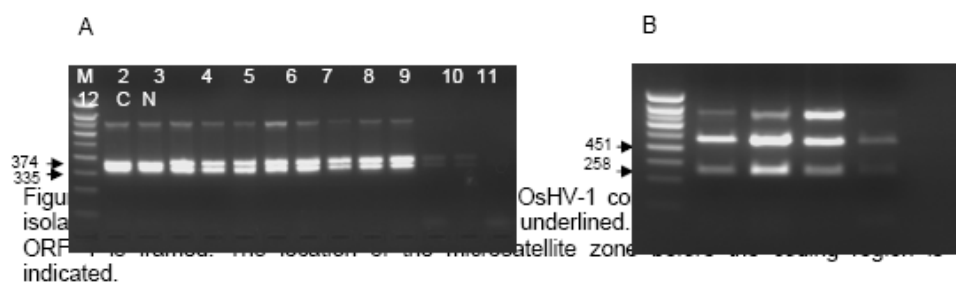


Figure 3: Restriction profiles obtained after digestion of PCR products C2/C6 by (A) *XhoI* and (B) *SylI*. All isolates have identical profiles, example of isolates: 2-12. C: reference DNA. N: negative control. : Size of PCR products in bp M: Small marker of size, (agarose gel 2%). Higher size spots from samples correspond to undigested PCR products due to excess of DNA.



C6 Primer

Figure 5: IA1/IA2 sequence alignments between OsHV-1 consensus and an OsHV-1 μ Var isolate. The locations of primers IA2 and IA1 are underlined. The initiation codon (ATG) for ORF 43 is framed. 15 isolates with 99% homology are identical and displayed a type profile of OsHV-1 μ Var.

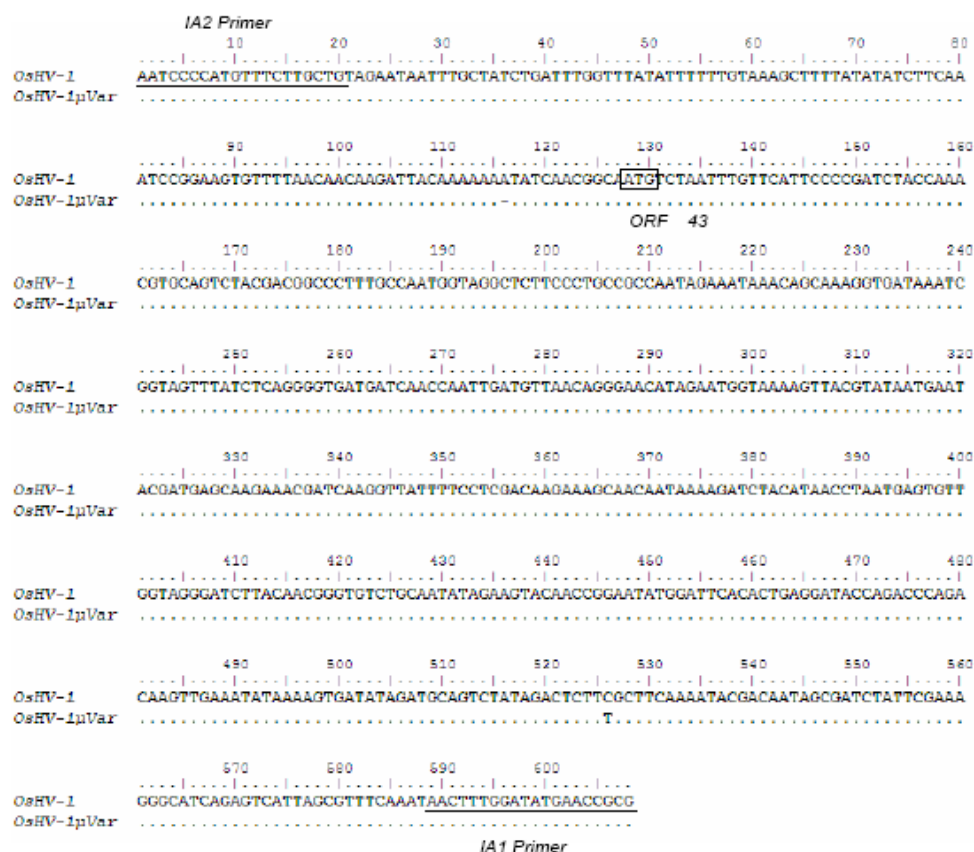
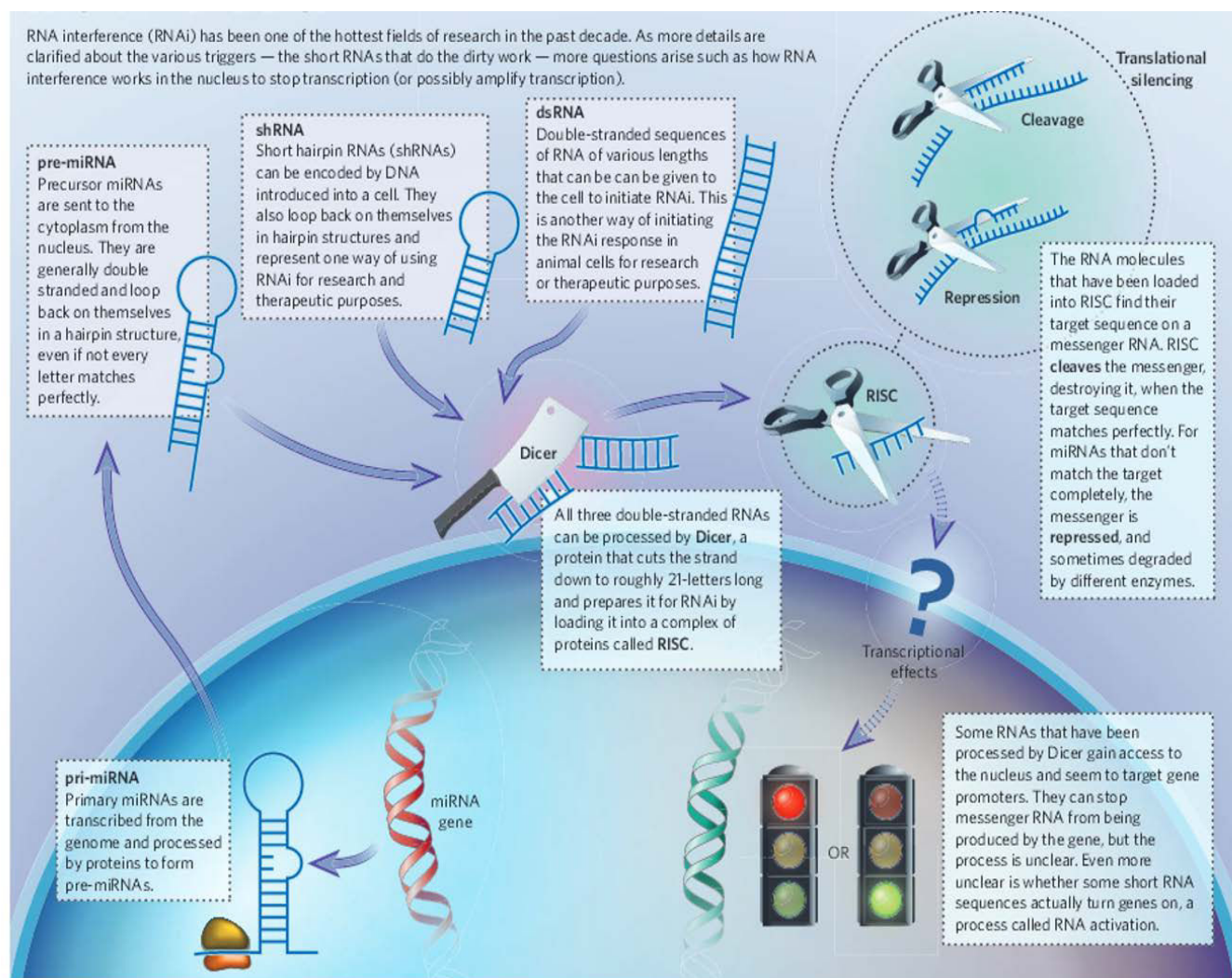


Figure 6: Alignment of amino acids sequences (ORF 4) between OsHV-1 reference and OsHV-1 μ Var.

OsHV-1 MQPFFTEFCTLTAKTSASNDFFINQRLTCDICKELVSEFQDKVVASLAAVRSDIPIEVTERKDLNLLDLIQFFZKKIEFTTLIDELFTAHKDHQ

OsHV-1 μ Var N.K.....

ANNEXE 2: LES DIFFERENTES VOIES D'ARN INTERFERENCE



Etude des interactions entre l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, et le virus Ostreid herpesvirus type 1

Résumé

Le virus ostreid herpesvirus type 1 (OsHV-1), peut être considéré comme un des agents infectieux majeurs affectant les élevages d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, en France et dans le monde. Des différences de mortalités ont été observées au sein de cette espèce lors de l'infection virale laissant suspecter une base génétique de la sensibilité à la maladie. Dans ce contexte, l'objectif principal du travail de thèse était de mieux comprendre les interactions entre l'huître creuse et OsHV-1, et plus particulièrement, les bases moléculaires du cycle viral. Les résultats obtenus montrent que le virus est capable de se répliquer chez l'hôte quel que soit son stade de développement et sa sensibilité à l'infection. Cependant, la cinétique de multiplication est plus rapide chez des individus les plus sensibles comparés aux animaux moins sensibles. Il apparaît également que chez les individus survivants suite à l'infection, le virus n'est plus détectable après une phase de réplication active. Cette observation laisse suspecter (i) une rémission avec une élimination du virus ou (ii) une persistance du virus sans symptômes détectables. Ces résultats mettent en lumière la possibilité du virus de circuler au sein des individus ne présentant pas de signes particuliers de maladie. Ces individus peuvent excréter des particules virales et intervenir ainsi dans le processus d'infection en milieu naturel. Les travaux réalisés ont également permis d'identifier des gènes d'intérêt chez l'huître creuse, pouvant intervenir dans les mécanismes de défense anti-viraux (IFI44, IAP, glypican, ...). L'ensemble de ces résultats représente une contribution à la compréhension du cycle d'OsHV-1 et des réponses de l'hôte, plus particulièrement au niveau moléculaire.

Mots-clés : bivalves, huître creuse, *Crassostrea gigas*, mortalités, OsHV-1, gènes viraux, interaction hôte-virus, transcriptome, sensibilité, PCR en temps réel

Studying interaction between the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, and Ostreid herpesvirus type 1

Abstract

Ostreid herpesvirus type 1 (OsHV-1) can be considered one of the major infectious agents in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France and all around the world. Differences in terms of mortality among infected animals were reported suggesting a genetic basis of the susceptibility to the OsHV-1 infection. In this context, the main objective of this thesis was to understand the interactions between Pacific oysters and OsHV-1, in particular, the molecular basis of the viral cycle. Results showed that the virus is able to replicate in the host regardless of its stage of development or its susceptibility. However, multiplication kinetics is faster in the most susceptible individuals compared to less susceptible ones. After an active replication phase, it would appear that the virus is no detectable in survival individuals. This observation suggests (i) a remission with elimination of the virus or (ii) virus persistence without detectable symptoms. These results highlight the ability of the virus circulating in the host without causing mortality. These individuals can excrete viral particles and interfere with the infection process in the field. Genes that could be involved in antiviral defenses were also identified in Pacific oysters (IFI44, IAP, glypican, ...). All these results represent a first contribution to the understanding of OsHV-1 cycle in Pacific oysters, particularly at the molecular level.

Key words: bivalve, Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, mortality, OsHV-, viral gene, interaction host-virus, transcriptome, susceptibility, real-time PCR