
Les interactions hôte-pathogène en milieu marin : le rôle clé de la température dans l'émergence, la transmission et la persistance des maladies

Les êtres vivants produisent de la matière (molécules, cellules, organes), des procédés (réactions chimiques, enzymatiques) du travail au sens physique (déplacements, soins aux juvéniles) et des réalisations matérielles (nid, galeries). Ces richesses suscitent des convoitises et de nombreux êtres vivants tentent de se les approprier par différentes stratégies d'interaction. Le parasitisme est l'une de ces stratégies, et consiste à retirer de l'énergie à un autre organisme (hôte) sans qu'il soit mort, sans qu'il soit une proie et sans qu'il n'en retire un quelconque avantage (Combes et al., 2018).

La finalité de l'interaction entre l'hôte et le parasite dépend à la fois de l'aptitude du parasite à coloniser son hôte et de la capacité de l'hôte à se défendre. Un hôte est qualifié de **susceptible** ou **réceptif** lorsqu'il permet la multiplication d'un pathogène ou à l'inverse de **réfractaire**. Une cellule est dite **permissive** lorsqu'elle permet à un pathogène d'assurer un cycle de réplication complet. Le terme **infection** qualifie l'invasion d'un organisme vivant (hôte) par un autre organisme ou virus (agent pathogène ou parasite). L'**infectivité** caractérise la capacité d'un agent pathogène à s'établir dans un hôte. Une **pathologie** ou **maladie** se définit comme l'ensemble des perturbations physiologiques et lésions induites par l'installation et la multiplication d'un agent pathogène dans un hôte. La **virulence** d'un agent pathogène mesure sa capacité à produire une maladie en conditions contrôlées. La **pathogénicité** est une notion épidémiologique qui décrit la capacité d'un agent pathogène avec une virulence connue à déclencher une maladie chez différents hôtes ou sous différentes conditions environnementales.

En milieu marin comme terrestre, les conditions environnementales telles que la température modulent fortement le risque d'émergence de pathogènes et leurs interactions avec leurs hôtes (Burge et al., 2014; Harvell et al., 2002). Les effets de la température sur une interaction hôte/pathogène dépendent à la fois de la variabilité thermique environnementale mais aussi des profils de tolérance thermique individuels de l'hôte et du pathogène. Ces profils de tolérance

thermique et de performance de l'hôte et du pathogène varient selon des courbes non linéaires et asymétriques qui peuvent être superposées (Figure 9, A) ou décalées (Figure 9, B). Lorsque les courbes de performance de l'hôte et du parasite sont décalées (Figure 9, B) l'effet de la température sur l'interaction hôte pathogène est beaucoup plus complexe que dans le cas précédent. Dans l'exemple présenté sur la Figure 9, les températures élevées favorisent l'hôte à la fois en optimisant ses réponses de défense et en limitant directement la croissance des agents pathogènes, ainsi la mortalité due aux agents pathogènes est réduite. Au contraire, les températures plus basses optimisent la croissance des agents pathogènes et réduisent l'efficacité de la défense de l'hôte induisant une potentielle augmentation des mortalités (Blanford and Thomas, 1999; Elliot et al., 2002).

Lors de l'étude de l'effet de la température sur une interaction hôte-pathogène, il apparaît donc essentiel de définir préalablement les gammes de tolérance thermique de chacune des parties.

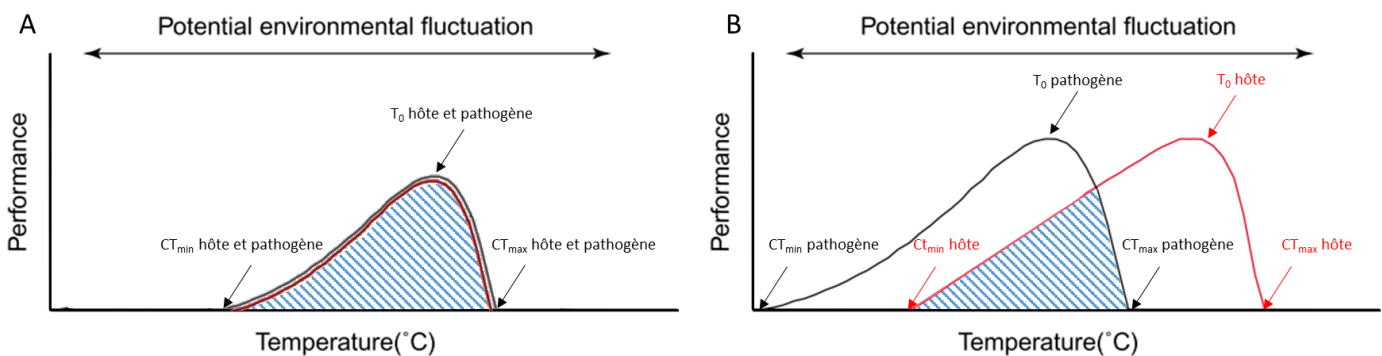


Figure 9 : Courbes de performance d'un ectotherme en rouge (réponse immunitaire, croissance, survie) et de son parasite en noir. En A les courbes de performance se superposent, en B elles sont décalées réduisant la zone thermique d'interaction (hachuré bleu), (Adapté d'après Blanford and Thomas, 2003)

1. Température, émergence et stabilité des pathogènes

De manière générale, la transmission et le développement des parasites augmente avec l'élévation de la température vers les limites de tolérance de l'hôte. Par exemple, la prolifération de parasites infectant les coquillages tels que *Perkinsus marinus*, *Haplosporidium nelsoni*, *Martelia refrigens*, et *M. cochillia*, est accentuée par l'augmentation saisonnière de la température et les aires de répartition géographique de ces pathogènes se décalent vers le nord avec la hausse des températures moyennes (revu par Guo and Ford, 2016).

- *Les virus marins*

Il existe très peu d'informations concernant l'effet de la température sur l'abondance, l'émergence et la persistance des virus marins. De rares données concernent les températures d'inactivation de virus de diatomées et de micro-algues (Danovaro et al., 2011; Mojica and Brussaard, 2014). Ces travaux semblent indiquer que ces virus sont particulièrement résistants aux variations de température et tolèrent des gammes de températures plus larges que celles de leurs hôtes respectifs.

Au contraire, la persistance du virus de la septicémie hémorragique (VHSV) qui infecte principalement les salmonidés, et l'infectivité de l'Abalone herpes virus (AbHV), semblent réduites par l'augmentation des températures (Corbeil et al., 2012; Parry and Dixon, 1997).

En effet, la température peut altérer la nature physique des virus, principalement composés de protéines (capside) et de membranes ou enveloppes lipidiques dans le cas des virus enveloppés. La température affecte la conformation structurale des protéines, l'activité enzymatique et la fluidité des lipides membranaires, et peut entraîner leur dénaturation ou rupture. Ainsi la persistance des virus est directement liée à la vulnérabilité de ses structures face à la température (Dimmioc, 1967; You et al., 2010).

2. La température module la sensibilité de l'hôte face aux pathogènes

a. La fièvre des homéothermes

La fièvre est une augmentation de la température corporelle qui survient chez les homéothermes en réponse à une infection. Elle est due à un dérèglement du centre thermorégulateur qui place la température d'équilibre à un niveau plus élevé qu'à la normale. La fièvre s'observe chez tous les homéothermes et est généralement causée par l'induction de la réponse inflammatoire. L'induction de la fièvre débute par la reconnaissance de pathogènes (virus, bactéries et champignons) par les récepteurs immunitaires qui activent alors les macrophages et cellules dendritiques qui libèrent des prostaglandines de type E2 (PGE2), des cytokines pyrogènes (Interleukines 1 et 6), ainsi que des Tumor necrosis factor (TNF) qui agissent pour induire la réponse fébrile. L'effet bénéfique de la fièvre sur les réactions immunitaires de l'hôte passe par l'optimisation de l'activité des cellules immunitaires et la stimulation de l'immunité innée et adaptative (Evans et al., 2015). De plus, l'hyperthermie permet dans certains cas de sortir de la zone de tolérance thermique du pathogène et induit l'inhibition de la croissance, de l'activité infectieuse et la dénaturation de ses protéines (Blatteis, 2003; Rodbard et al., 1980).

b. Fièvre comportementale

A la différence des homéothermes, les ectothermes ne possèdent pas la capacité d'augmenter physiologiquement (thermogenèse) ou de maintenir leur température interne. Mais en réponse à une infection (mimée par injection de pathogènes ; Figure 10), par la fièvre comportementale, les ectothermes augmentent leur température interne de quelques degrés au-dessus de leur température optimale, en se déplaçant vers des zones plus chaudes ou en accentuant leur activité physique (Evans et al., 2015; Kluger, 1979; Rakus et al., 2017). Cette adaptation semble conservée chez la majorité des ectothermes depuis les vertébrés (poissons, amphibiens, reptiles) jusqu'aux arthropodes et annélides et permet dans de nombreux exemples d'augmenter significativement la survie de l'hôte (Kluger, 1979; Rakus et al., 2017).

Chez certaines espèces de sauterelles et de criquets, les comportements de thermorégulation sont modifiés lors d'infections pour atteindre une nouvelle température optimale de 2°C à 5°C au-dessus de la température optimale habituelle (Thomas and Blanford, 2003). Les sangsues (annélides) injectées avec des lipo-polysaccharides bactériens fréquentent plus intensément les

zones chauffées à 29.6°C que les zones à 20.5°C fréquentées par les animaux témoins (Cabanac, 1989). De même l'injection d'une souche atténuée de la bactérie pathogène *Aeromonas hydrophila* dans la cavité branchiale ou dans l'abdomen de l'écrevisse *Cambarus bartoni* induit une augmentation du préférendum thermique de 22.1°C à 24°C (Casterlin and Reynolds, 1980, 1977). La fièvre comportementale a aussi été observée chez des mollusques gastéropodes en réponse à l'injection d'acide polyinosinic-polycytidylic (Poly (I :C)), un ARN double brin semblable à celui de certains virus (Zbikowska et al., 2013).

Du point de vue des mécanismes moléculaires, les prostaglandines et les cytokines ont été identifiées chez de nombreux ectothermes vertébrés et invertébrés (Ruggeri and Thoroughgood, 1985; Stanley-Samuelson, 1987). L'injection de PGE1 dans le céphalothorax des scorpions ou chez les écrevisses induit une réponse de fièvre comportementale chez ces invertébrés (Cabanac et al., 1980; Casterlin and Reynolds, 1980).

	Species	Activator of fever*	Investigators
BIRDS	<i>Gallus domesticus</i>	<i>E. coli</i> endotoxin (iv)	van Miert and Frens (1968)
	<i>Gallus domesticus</i>	<i>Salmonella abortus equi</i> endotoxin (ant. hypothal.)	Pittman et al. (1976)
	<i>Gallus domesticus</i>	Prostaglandin E ₁ (ant. hypothal.)	Pittman et al. (1976)
	<i>Columba livia</i>	<i>Pasteurella multocida</i> (iv, ip)	D'Alecy and Kluger (1975)
REPTILES	<i>Dipsosaurus dorsalis</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> (intracardiac, [ic])	Vaughn et al. (1974)
	<i>Dipsosaurus dorsalis</i>	<i>Pasteurella haemolytica</i> (ic)	Kluger (1978a)
	<i>Dipsosaurus dorsalis</i>	<i>Citrobacter diversus</i> (ic)	Kluger (1978b)
	<i>Dipsosaurus dorsalis</i>	lizard or rabbit-derived endogenous pyrogen (ic)	Bernheim and Kluger (1977)
	<i>Iguana iguana</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> (ic)	Kluger (1978a)
AMPHIBIANS	<i>Hyla cinerea</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> (sc)	Kluger (1977)
	<i>Rana pipiens</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> (ip)	Casterlin and Reynolds (1977b)
	<i>Rana catesbeiana</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> (ip)	Casterlin and Reynolds (1977b)
	<i>Rana esculenta</i>	<i>Mycobacterium sp.</i> (ip)	Myhre et al. (1977)
	<i>Rana esculenta</i>	frog-derived endogenous pyrogen (ip)	Myhre et al. (1977)
	<i>Rana esculenta</i>	Prostaglandin E ₁ (diencephalon)	Myhre et al. (1977)
FISHES	<i>Micropterus salmoides</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> (ip)	Reynolds et al. (1976)
	<i>Lepomis macrochirus</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> (ip)	Reynolds et al. (1976)
	<i>Lepomis macrochirus</i>	<i>E. coli</i> endotoxin (ip)	Reynolds et al. (1978a)
	<i>Lepomis macrochirus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (ip)	Reynolds et al. (1978a)
	<i>Carassius auratus</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> (ip)	Reynolds and Covert (1977)
	<i>Carassius auratus</i>	<i>E. coli</i> endotoxin (ip)	Reynolds et al. (1978b)

* Stimulus used by investigators to induce fever.

Figure 10 : Réponse fébrile chez les vertébrés ectothermes (issu de Kluger 1979)

c. Température et sensibilité aux pathogènes chez les invertébrés

- *Les effets délétères*

Nous avons vu dans le chapitre précédent qu'une élévation de la température au-delà des températures optimales pouvait induire une augmentation de la demande en oxygène cellulaire et de l'énergie nécessaire à la maintenance (Bayne, 2017; Dame, 1972; Kooijman, 2009). Or la réponse immunitaire des organismes est intimement liée aux ressources énergétiques disponibles. Lorsque celles-ci sont limitées, il existe un compromis entre l'énergie allouée à la réponse immunitaire et celle investie dans la reproduction et la croissance. Ainsi, il a été mis en évidence que l'activation et l'utilisation du système immunitaire sont des processus aux coûts énergétiques importants et sont difficilement maintenues simultanément avec d'autres processus coûteux (Moret et al., 2014).

Chez les mollusques, la réponse aux pathogènes repose en partie sur l'activité des cellules immunitaires, les hémocytes (voir III.5). Ils sont impliqués dans la dégradation, la phagocytose et l'encapsulation de corps étrangers grâce aux enzymes hydrolytiques présentes dans les hémocytes, mais aussi par leur capacité de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'exposition de mollusques marins à des hautes températures induit une forte mortalité des hémocytes, ainsi que la diminution de leurs capacités de phagocytose, d'étalement, de leur locomotion et de leur activité lysosomale impliquée dans la dégradation des pathogènes (Chen et al., 2007; Fisher, 1988; Gagnaire et al., 2006; Hégaret et al., 2003; Monari et al., 2007; Paillard et al., 2004; Wang et al., 2012; Yu et al., 2009). Ces données suggèrent que les hautes températures augmentent la sensibilité des mollusques aux infections bactériennes. Cependant, des résultats contradictoires montrent par exemple que chez la moule l'activité phagocytaire et le nombre total d'hémocytes étaient augmentés à 15°C par rapport à celle des moules maintenues à 10°C (Ellis et al., 2011; Parry and Pipe, 2004)

- Les effets bénéfiques

L'effet bénéfique des hautes températures sur l'interaction du White Spot syndrome virus (WSSV) et des crustacés tels que *Litopenaeus vannamei*, *Marsupenaeus japonicus*, *Procambarus clarkii*, *Penaeus monodon*, *Pacifastacus leniusculus* est l'un des mieux défini parmi les invertébrés marins. La réplication du WSSV est optimale lorsque la température de l'eau de mer avoisine les 27°C (Rahman et al., 2006). A cette température, les cheptels de crustacés sont décimés à 100% en 8 jours environ (Vidal et al., 2001). Lorsque les crustacés sont maintenus dans une eau de mer à 32°C (hyperthermie) pendant l'infection par WSSV, la survie est supérieure à 80% (Vidal et al., 2001). La réduction des mortalités ne semble pas liée à une inactivation ou à la dégradation du WSSV et la température ne modifie pas l'efficacité du virus (Granja et al., 2006; Jiravanichpaisal et al., 2004; Vidal et al., 2001). Or, l'exposition à 32°C limite la réplication du WSSV dès le début de l'infection (Du et al., 2006; You et al., 2010). Ainsi, il est proposé que la température puisse moduler les premières étapes d'adsorption du virus, de synthèse des protéines et d'acides nucléiques pour le virus ou encore les activités enzymatiques nécessaires à la réplication virale (Guan et al., 2003). Durant cette hyperthermie, la température ne semble pas modifier la réponse immunitaire des crustacés (You et al., 2010). Cependant, le nombre de cellules apoptotiques augmente avec la température et cet effet semble limiter la réplication virale de WSSV (Granja et al., 2003; Wu et al., 2015). Par la suite, il a été montré que les gènes viraux s'exprimaient à 2 heures et à 4 heures post infection chez les crustacés infectés à 32°C, avec un niveau de transcription plus important à 32°C qu'à 25°C, mais sans synthèse de protéines virales à 32°C. Cette étude suggère une inhibition de la synthèse des protéines virales à hautes températures (Lin et al., 2011) et propose l'implication des protéines HSP70 et de l'Aldéhyde déshydrogénase (ALDH) de l'hôte dans la répression de la synthèse et du repliement des protéines du WSSV. Ces résultats sont confirmés par le knockdown des gènes hsp70 et ALDH qui restaurent l'infection et les mortalités subséquentes, même à haute température (Lin et al., 2011; Wu et al., 2015). A l'heure actuelle, les traitements thermiques sont utilisés en production de crustacés pour limiter les mortalités causées par le white spot syndrome virus.

III. Le cas spécifique de l'huître creuse *Crassostrea gigas* et du virus

OsHV-1

Les huîtres ont toujours été consommées sur le littoral, comme en témoignent des vestiges retrouvés en Charente Maritime datant du néolithique. Au moyen Age, les gisements naturels d'huîtres plates (*Ostrea edulis*) de Normandie, de Cancale ou d'Aquitaine sont largement exploités et approvisionnent toute la France. C'est au XVII^{ème} siècle que les premières cultures d'huîtres ont lieu sur la côte Atlantique. Le naissain sauvage est récolté puis mis en croissance dans les bassins de marais salants, mais à cette époque les bancs naturels sont très appauvris. En 1860, pour préserver les gisements d'huîtres plates, Napoléon III encourage l'importation d'huîtres portugaises, *Crassostrea angulata*. Cette espèce est robuste et dotée d'une croissance rapide et rapidement, elle s'acclimate en Gironde. La production de l'huître portugaise est rentable et supprime rapidement celle de l'huître plate locale (*Ostrea edulis*). L'ostréiculture française est alors prolifique. Mais à partir de 1967, des épidémies surviennent attribuées à un virus de type iridovirus telles que la maladie des branchies et la maladie hémocytaire qui vont complètement éradiquer l'huître portugaise (Comps, 1988). Dans ces mêmes années, les bancs d'huîtres plates sont réduits et subissent d'importantes épizooties telles que la martelliose ou la bonnamiose. Pour pallier à ces pertes, l'huître japonaise (*Crassostrea gigas*, huître creuse) est introduite et distribuée dans les différents bassins ostréicoles entre 1971 et 1975 (Grizel and Héral, 1991).

1. L'huître creuse, *Crassostrea gigas*

L'huître creuse est un mollusque bivalve constitué d'un corps mou et protégé par une coquille à deux valves asymétriques. Les valves sont reliées par la charnière et par un muscle adducteur composé d'une part de fibres musculaires lisses et d'autre part de fibres striées. La coquille se ferme en période d'exondation et lors de stress. L'huître creuse est un hermaphrodite protandre. L'émission des gamètes a lieu en été, lorsque la température de l'eau de mer dépasse les 16°C à 18°C. Une vingtaine de jour après la fécondation, l'huître mesure environ 300 µm et ressemble en tout point à un adulte, elle est définitivement fixée à son substrat où elle poursuivra son développement.

Les jeunes huîtres sont communément appelées « naissain » avant l'acquisition de leur maturité sexuelle, environ au bout d'un an. Elles atteignent une taille commercialisable au bout d'environ trois ans. *Crassostrea gigas* est aujourd'hui largement exploitée en France avec environ 130 000 tonnes d'huîtres produites chaque année. Initialement originaire du Japon, l'huître creuse se retrouve aujourd'hui le long des côtes de presque tous les continents (FAO).

2. *Crassostrea gigas* et la température

a. Tolérance thermique

Comme la majorité des espèces intertidales l'huître creuse est ectotherme et eurytherme. Les fourchettes de tolérance thermique varient selon les régions d'origine de l'huître creuse et de ses stades de développement. On définit que chez l'adulte, les températures moyennes permettant la croissance se situent entre 11°C et 34°C, et entre 20°C et 25°C pour la ponte (Bayne, 2017). Pour les populations de la côte Atlantique française, la croissance a lieu à des températures comprises entre 3.5°C et 24.5°C et la ponte à des températures entre 18°C et 22.5°C (Figure 11, Bayne, 2017). Pour des larves, la croissance est maximale autour de 31°C (Bayne, 2017). Pour le naissain utilisé au laboratoire pour les analyses expérimentales (Naissain Standardisé Ifremer ou NSI), la majorité des individus cessent de s'alimenter aux alentours de 33°C et l'alimentation devient nulle à 35°C. Lorsque la température est augmentée de 1°C toutes les 48h, la majorité des huîtres NSI meurt vers 39°C, les dernières huîtres survivent jusqu'à 41°C (Com pers M. Alumno-Bruscia).

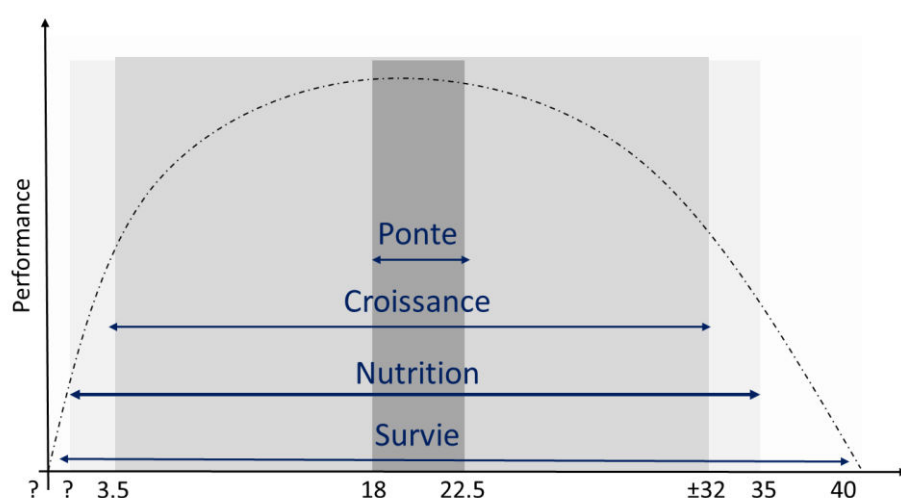


Figure 11: Fenêtres thermiques auxquelles la ponte, la croissance, la nutrition, et la survie sont observées chez *C. gigas*.

b. Ecophysiologie

Conformément à la majorité des organismes, le rythme cardiaque, la consommation d'oxygène et la filtration augmentent avec la hausse de la température de l'eau de mer chez *C. gigas*. Comme l'illustre la Figure 12, l'augmentation de ces paramètres se maintient de 5 à 20°C (Bougrier et al., 1995; Friedman et al., 1999; Lowe, 1974). Au-delà de 20°C, le taux de filtration diminue alors que la consommation d'oxygène et le rythme cardiaque augmentent. En conséquence, la croissance se poursuit jusqu'à 30°C puis décline avec la température (Bougrier et al., 1995).

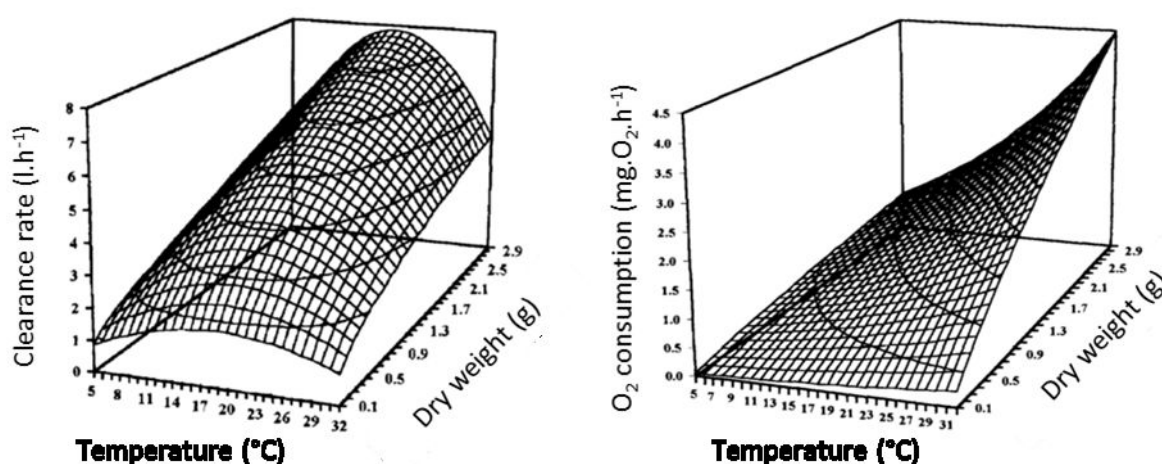


Figure 12 : Représentation des modèles mathématiques reliant le taux de filtration (à gauche) et la consommation d'Oxygène (à droite) à la température et à la masse d'huîtres (Bougrier et al, 1995)

c. Réponses transcriptomiques et protéiques

Les nouvelles techniques de séquençage d'ADN (NGS), facilitant l'accès aux génomes d'organismes non modèles, et le développement associé des approches post-génomiques (eg. transcriptomique et protéomique globale) ont permis d'apporter une vue globale des mécanismes induits chez les bivalves en réponse aux hautes températures.

Le séquençage du génome de l'huître creuse a mis en évidence la présence de 88 gènes codant des HSP70 (HSP de taille de 70 kDa) contre seulement 17 chez l'Homme et 39 chez l'oursin.

La grande quantité de gènes HSPs chez l'huître pourrait expliquer sa grande tolérance aux variations de température (Zhang et al., 2012). Certains de ces gènes sont massivement surexprimés en réponse à un stress thermique : en moyenne, l'expression des transcrits codant les HSPs est augmentée de 13.9 fois lors de l'exposition à des hautes températures (Zhang et al., 2012). L'expression et le seuil d'induction des HSPs varient selon les saisons, à mesure que les températures du milieu évoluent (Jackson et al., 2011). Chez *C. gigas*, les HSPs sont plus exprimées en été qu'en hiver. A titre d'exemple, l'HSP69 est induite à 33°C–37°C en janvier et plutôt à 40°C–43°C en août (Hamdoun et al., 2003). L'exposition des huîtres à une température de 25°C induit des changements protéomiques et transcriptomiques majeurs (Figure 12; Clark et al., 2013b; Zhang et al., 2012; Zhang et al., 2015). Cette température modifie l'expression de certains gènes du métabolisme énergétique, et induit l'activation des processus cataboliques (lipolyse), l'augmentation du métabolisme aérobie et des flux de glucose et d'acides gras (Clark et al., 2013; Meistertzheim et al., 2007; Zhang et al., 2015b). La température induit l'expression de gènes impliqués dans les processus transcriptionnels et traductionnels, dans l'activation des processus de réparation de l'ADN et de réorganisation du cytosquelette (Meistertzheim et al., 2007; Zhang et al., 2015b). Les flux énergétiques semblent majoritairement dirigés vers la réponse au stress et les processus de réparation cellulaire (membranes lipidiques, ADN) au détriment de la croissance tissulaire.

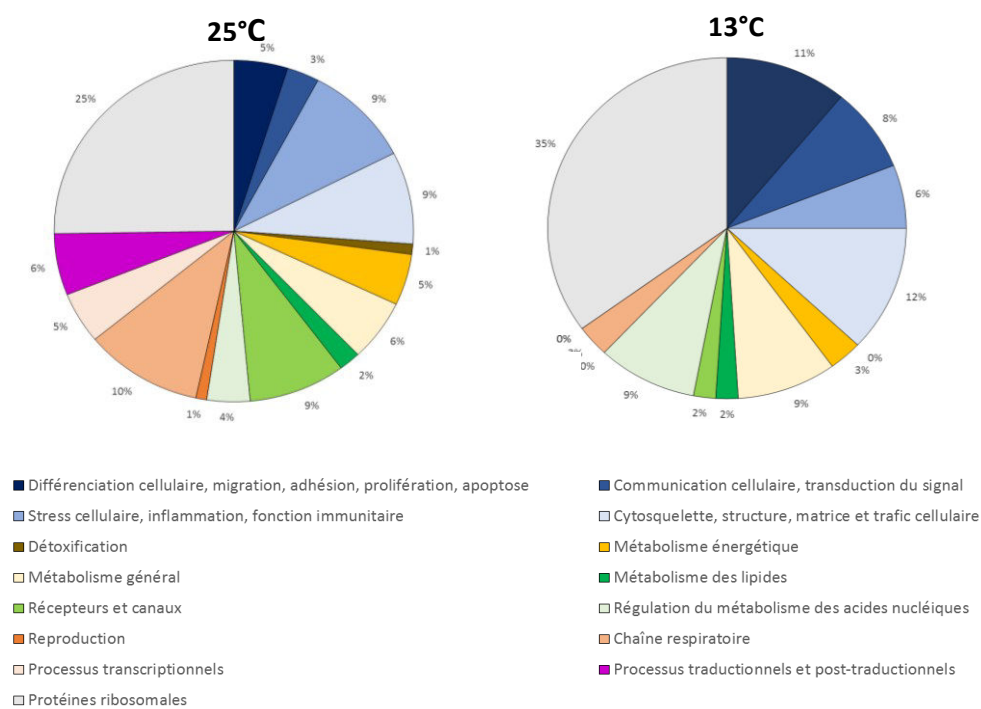


Figure 13 : Classification fonctionnelle des séquences différentiellement exprimées dans les branchies et le manteau d'huîtres *C. gigas* après 10 jours exposés en eau de mer à 25°C ou à 13°C. (Meistertzheim et al, 2007)

d. Biogéographie

La température par son effet sur la physiologie des organismes aux niveaux moléculaire, cellulaire et physiologique, détermine la qualité des habitats et sous-tend la répartition biogéographique des espèces (Hochachka and Somero, 2002). Les travaux de Thomas et al. (2016) illustrent le rôle majeur de la température dans l'évolution des zones de répartition de *Crassostrea gigas* en France (Thomas et al., 2016). Au moment de son introduction en Europe dans les années 1970, Bourgneuf (Estuaire de la Loire) constituait la limite nord de la zone de reproduction de *C. gigas*. Dès 1990, des reproductions naturelles ont été décrites en Allemagne, au Danemark en Suède et en Norvège, et aujourd'hui des populations d'huîtres creuses naturelles sont présentes de Gibraltar à la Norvège (Figure 14). La ponte est influencée par la température: sa survenue dans les différentes populations européennes d'huîtres creuses suit un gradient Sud-Nord correspondant à l'augmentation saisonnière des températures (Figure 14). L'augmentation moyenne de la température de l'eau de mer a déjà induit un déplacement de la niche de reproduction et de croissance des larves de *C. gigas* de 1400 km en 30 ans (Thomas et al., 2016).

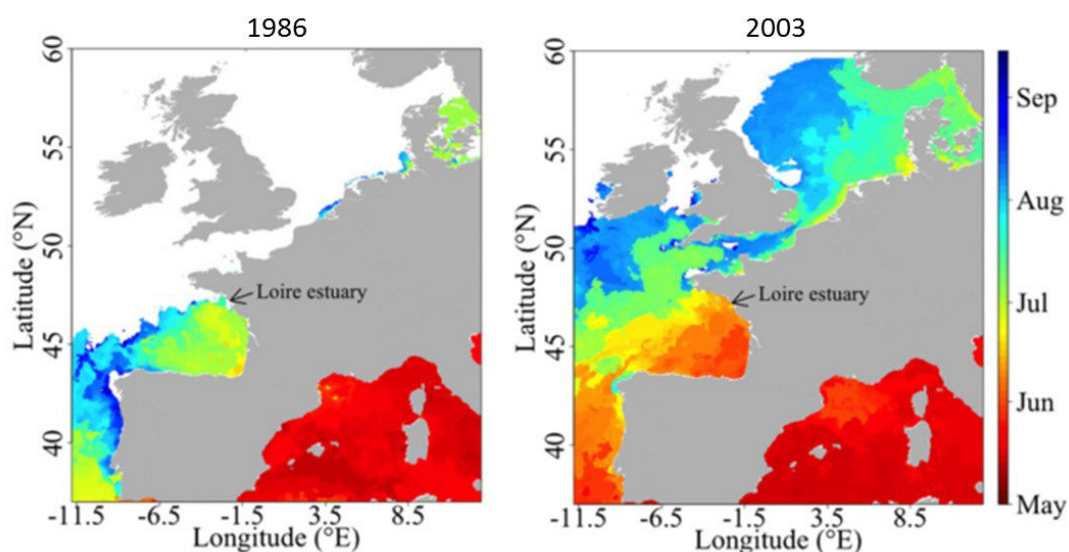


Figure 14 : Simulation de la distribution spatiale de la date de ponte le long des côtes européennes lors d'une année froide en 1986 et d'une année chaude 2003. Aucune ponte n'a lieu dans les zones blanches. (Thomas et al., 2016).

3. Huîtres creuses et pathogènes

Fixées dans un milieu ouvert, les huîtres sont largement exposées à de nombreux agents pathogènes. Depuis son introduction, *C. gigas* est affectée par des phénomènes de mortalités massives survenant à différents stades de son développement et principalement en été. En France à partir de 2008, les épisodes de mortalités se sont fortement aggravés, décimant parfois jusqu'à 100% des jeunes huîtres. Plusieurs agents pathogènes ont été isolés à de nombreuses reprises à partir d'huîtres creuses lors d'épisodes de mortalités (Garnier et al., 2008, 2007; Lemire et al., 2015; Petton et al., 2015b), et identifiés comme agents responsables des mortalités : l'ostreid herpesvirus de type 1 (OsHV-1) et plus particulièrement l'haplotype μ Var, ainsi que des bactéries du genre *Vibrio* spp, telles que *V. splendidus*, *V. aestuarianus*, *V. tubiashii* ou *V. Crassostreae*.

Récemment, une étude de grande ampleur a pu éclaircir l'implication de ces différents pathogènes dans le déroulement de la maladie, en comparant des huîtres de familles sensibles et résistantes à la mortalité (de Lorgeril et al., 2018). Les résultats montrent qu'OsHV-1 cible dans un premier temps les hémocytes pour sa réplication. L'infection virale déstabilise la réponse immunitaire de l'huître vis-à-vis des bactéries induisant une baisse de la synthèse de peptides antimicrobiens. Il en résulte une importante modification du microbiote qui conduit à la colonisation de l'huître par des bactéries opportunistes des genres *Vibrio* ou *Arcobacter* et finalement à une septicémie qui finira par entraîner la mort de l'huître (de Lorgeril et al., 2018).

4. L'Ostreid herpesvirus de type 1 (OsHV-1)

C'est en 1972 aux USA que pour la première fois la détection d'un virus de type herpès est associée aux mortalités d'huîtres adultes *Crassostrea virginica* (Farley et al., 1972). A partir des années 1991, des virus similaires sont identifiés en France lors de mortalités importantes de larves et de naissains (Nicolas et al., 1992; Renault and Novoa, 2004). En 1995, un virus est isolé à partir d'un lot de larves infectées provenant d'écloseries françaises (Le Deuff and Renault, 1999) et le génome est séquencé (Davison et al., 2005). Par ses caractéristiques structurales et génomiques, le virus est alors classé premier membre de la famille des Malacoherpesviridae, ordre des Herpesvirales et nommé Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) (Davison, 2002; Davison et al., 2005).

a. Distribution géographique d'OsHV-1

A partir de 2008, l'ampleur des épisodes de mortalités s'intensifie et touche spécifiquement les jeunes huîtres âgées de moins d'un an dès que la température de l'eau de mer dépasse 16°C (Pernet et al., 2012; Petton et al., 2013). Ces mortalités s'expliquent par l'émergence d'un micro-variant du virus nommé OsHV-1 μ Var (EFSA, 2015, 2010; Segarra et al., 2010). En 2008, OsHV-1 μ Var est identifié en France (Martenot et al., 2011; Renault et al., 2012; Segarra et al., 2010) et en Irlande (Peeler et al., 2012) puis en Grande-Bretagne en 2010 (EFSA, 2010; Lynch et al., 2012). Par la suite, OsHV-1 ainsi que des variants sont détectés en Espagne lors d'importants épisodes de mortalités (Roque et al., 2012), au Portugal (Batista et al., 2015) puis en Italie (Dundon et al., 2011), aux Pays-Bas (Gittenberger et al., 2016) en Scandinavie (Mortensen et al., 2016), puis en Nouvelle-Zélande et en Australie (Paul-pont et al., 2014) et enfin en Asie (Hwang et al., 2013). Ainsi OsHV-1 μ Var est actuellement distribué sur l'ensemble des côtes européennes, en Asie, sur les côtes du continent américain, et en Océanie (Figure 15) (EFSA, 2015).

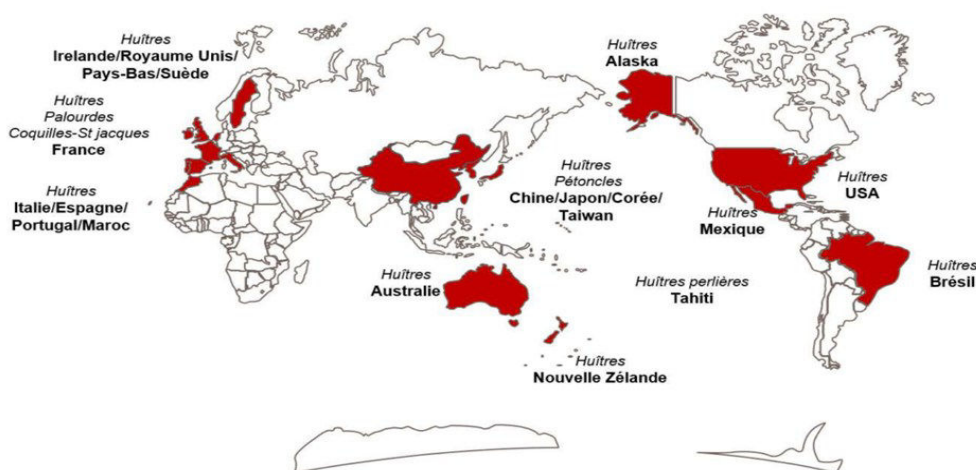


Figure 15 : Répartition mondiale d'OsHV-1 et ses variants (Segarra ; 2014)

b. Transmission virale

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., 2011), et de fortes quantités d'ADN viral sont

détectées dans les bassins d'huîtres infectées par OsHV-1. Le maintien d'huîtres saines dans de l'eau de mer ayant contenu des huîtres infectées suffit à induire une infection virale et la mort (Fuhrmann et al., 2016; Schikorski et al., 2011).

Afin d'infecter des huîtres lors d'expérimentation en laboratoire, plusieurs techniques sont possibles. Les huîtres peuvent être soit directement injectées avec une suspension virale, soit infectées selon des techniques de balnéation dans une eau infectieuse (Schikorski et al., 2011). Or pour ces deux techniques, les dynamiques infectieuses, les doses virales nécessaires, et la persistance virale dans le milieu demeurent mal connues, alors que ces données sont essentielles à la standardisation des méthodes d'infection et à l'interprétation des résultats. De récents travaux menés au laboratoire ont analysé précisément les paramètres de transmission d'OsHV-1 et des *vibrios* associés lors de la technique de cohabitation, pendant laquelle des huîtres infectées en mer (donneurs) sont mises en cohabitation avec des animaux sains (receveurs) (Petton et al., in prep.). Une heure et 30 minutes de cohabitation suffisent à détecter l'ADN viral et à induire des mortalités chez les huîtres receveuses placées en cohabitation avec les donneurs. Ces résultats mettent aussi en évidence que la quantité d'ADN viral dans l'eau de mer atteint son maximum dès 48h de cohabitation et devient nulle après environ 170 heures. La mortalité des receveurs augmente avec le temps d'exposition aux donneurs selon une relation dose-réponse et diminue avec les renouvellements d'eau qui limitent l'accumulation de particules virales dans le milieu. Les mortalités des receveurs surviennent environ 96 heures après le début de la cohabitation et se stabilisent après 135 heures, le maximum est atteint après 160h à 180h.

La Figure 16 présente les différentes méthodes d'infection des huîtres par OsHV-1 actuellement utilisées. La première méthode consiste à injecter des huîtres donneuses avec une suspension virale pour les placer ensuite en cohabitation avec les huîtres à infecter dans un même bac expérimental. Bien que les huîtres donneuses soient injectées avec une suspension virale purifiée, aucune étude actuelle ne porte sur la transmission de la microflore et des bactéries pathogènes associées à cette injection. La seconde méthode est très similaire à la première, exception faite que les huîtres donneuses sont naturellement infectées par les pathogènes en milieu naturel (virus et bactéries). Une troisième technique consiste à infecter des huîtres en milieu naturel puis de les disposer dans un bassin différent de celui des receveurs, l'infection était alors réalisée par transfert de l'eau de mer contenant les pathogènes vers les huîtres receveuses. Cette technique permet de réduire la dose virale transmise aux receveurs. Dans de nombreuses études, les huîtres sont infectées par l'injection d'une suspension virale directement dans le muscle adducteur, permettant principalement de synchroniser l'infection entre les animaux étudiés et de standardiser la dose virale injectée. Cette dernière méthode s'affranchit des voies naturelles d'entrée du virus dans son hôte et des barrières biologiques et physiques hôtes qui s'opposent à l'infection virale comme par exemple le mucus. L'injection d'une suspension virale est donc peu représentative de l'infection en milieu naturel.

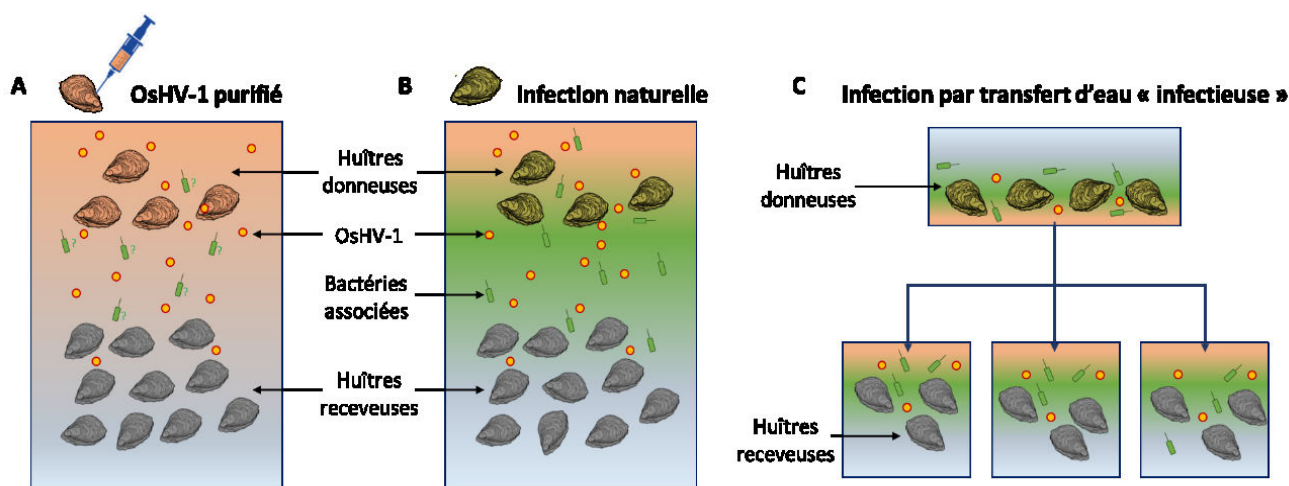


Figure 16 : Schéma présentant les différentes méthodes expérimentales d'infection des huîtres creuses par OsHV-1. Les cercles orangés représentent les particules virales d'OsHV-1, tandis que les bactéries associées apparaissent en vert.

c. Structure d'OsHV-1

De manière générale, toutes les particules virales (virions) possèdent une structure caractéristique dont les rôles principaux sont la protection du génome pendant les phases extracellulaires du cycle viral mais aussi la reconnaissance des potentielles cellules hôtes permettant la multiplication virale. Les éléments composant un virion sont l'enveloppe, la capside (de capsa : boîte) et le génome (Figure 17).

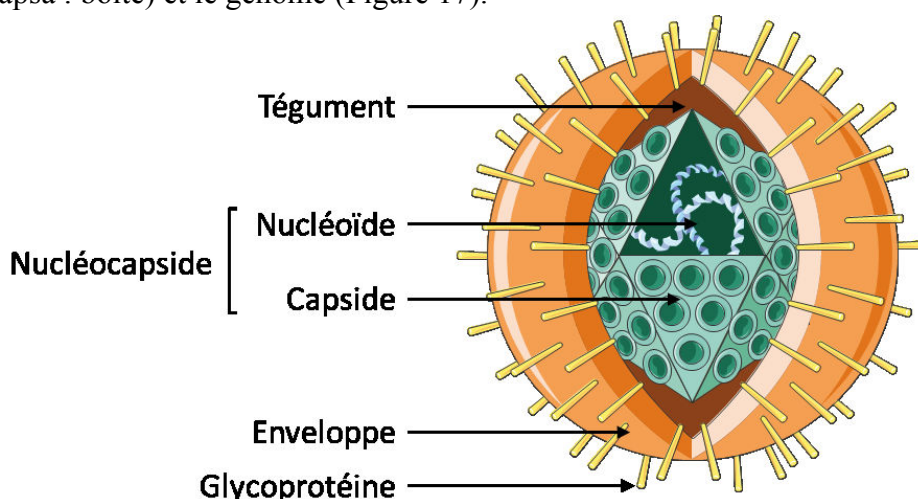


Figure 17 : Structure d'une particule virale de type herpesvirus

L'enveloppe n'est présente que chez les espèces de virus enveloppés comme les herpesvirus : elle est constituée d'une bicouche lipidique qui provient des membranes cellulaires de l'hôte à partir desquelles le bourgeonnement du virus s'est effectué. La composition lipidique de ces membranes n'est actuellement pas décrite pour les herpesvirus. Chez l'homme, dans le cas du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le lipidome de l'enveloppe virale a révélé que la composition s'apparentait à celle des micro-domaines membranaires que sont les radeaux lipidiques, caractérisés par la présence en grandes quantités de lipides saturés, de phosphatidylserine, de plasményl-ethanolamine, de cholestérol et de sphingolipides (Brugger et al., 2006). L'enveloppe virale comporte aussi des protéines d'origine hôte ou virale impliquées dans les interactions avec les récepteurs cellulaires de l'hôte. Les herpesvirus possèdent une matrice (tégument) constituée de protéines virales, présente sous la bicouche lipidique, qui stabilise l'enveloppe virale.

La **capside** se compose d'un assemblage de protéines codées par le génome viral. Il existe plusieurs types de structure de capsid. La capsid d'OsHV-1, comme celles des herpesvirus, possède une symétrie icosaédrique (de triangulation $T=16$, Figure 18 ;Davison et al., 2005). Cette structure est obtenue par l'assemblage de capsomères qui se composent de sous unités protéiques assemblées par 5, les « pentons » (forme convexe et situés aux niveaux des sommets) ou par 6, les hexons (forme plane localisée sur les faces et les arêtes de l'isocaèdre). La capsid d'OsHV-1 est composée de 162 capsomères soit 150 hexons et 12 pentons ; son diamètre est estimé à environ 116 nm, plus petit que celle de l'herpès simplex (HSV-1 : 125nm ; Davison et al., 2005).

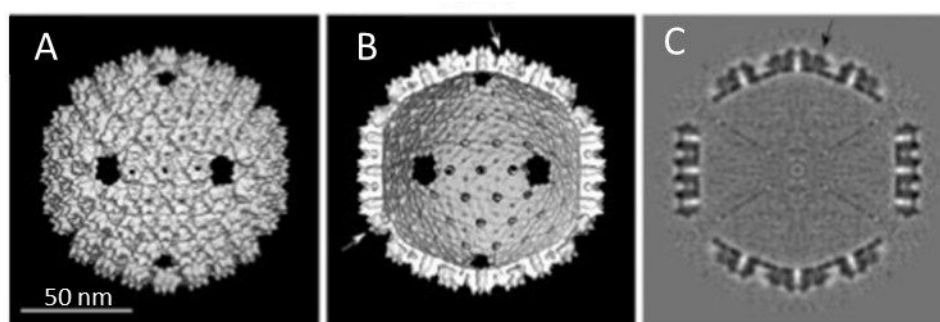


Figure 18 : Reconstruction microscopique de la capsid de l'Ostreid herpesvirus de type 1 (OsHV-1). A : structure extérieure, B : surface intérieure, C : coupe centrale de la capsid (Davison et al., 2005).

d. Le Génome d'OsHV-1

Le génome d'OsHV-1 est intégralement séquencé (GenBank accession number AY509253), (Davison et al., 2005). OsHV-1 est un virus à ADN double brin ; il possède un génome de taille relativement grande de 207 439 paires de bases (pb) avec une composition en G+C de 38.7% (Davison et al., 2005). On représente la structure globale du génome d'OsHV-1 de la façon suivante (Figure 19) : $TR_L-U_L-IR_L-X-IR_S-U_S-TR_S$ (Davison et al., 2005; Segarra et al., 2015). Le génome d'OsHV-1 s'organise en deux régions uniques non répétées : une région longue : (UL : unique long) de 167 843 pb et une région courte (US : unique short) de 3 370 pb. Chaque région unique, est flanquée de séquences répétées inversées nommées TR_L/IR_L lorsqu'elles sont localisées de part et d'autre de la région U_L , et TR_S/IR_S si elles se localisent autour de la région U_S . Finalement, une troisième région unique (X de 1 510 pb) est retrouvée entre les séquences

IR_L et IR_S (IR: région répétée interne short : S ou long : L). L'analyse du génome d'OsHV-1 indique la présence de 124 gènes uniques codant pour des protéines.

Parmi les gènes viraux, douze gènes codent des enzymes de types ATPases (ORF109), hélicases (ORF7, ORF49, ORF67 et ORF115), primases (ORF24), DNA polymerases (ORF100), dUTPase (ORF27, ORF34, ORF75) et ribonucléotide réductase (ORF20, ORF51).

Dix-huit gènes codent des protéines membranaires : ORF16, ORF25, ORF32, ORF36, ORF41, ORF54, ORF57, ORF59, ORF63, ORF65, ORF68, ORF72, ORF77, ORF80, ORF84, ORF88, ORF103, ORF111.

Huit gènes possèdent des motifs à doigt de zinc caractéristiques de facteurs de transcription : ORF38, ORF53, ORF96, ORF97, ORF117, ORF118, ORF121, ORF124.

Quatre gènes codent des inhibiteurs d'apoptose avec un motif Baculovirus Inhibitor of apoptosis Repeat (BIR) : ORF42, ORF87, ORF99, ORF106.

Quatre-vingt gènes, soit 65.3% du génome total, codent pour des protéines ne présentant aucune homologie avec aucune protéine actuellement décrite dans les génomes séquencés jusqu'à aujourd'hui (Davison et al., 2005; Segarra, 2015).



Figure 19 : Organisation du génome d'OsHV-1 (Davison et al., 2005; Segarra et al., 2015)

L'analyse des séquences des gènes d'OsHV-1 n'a révélé que très peu d'homologie avec les séquences des autres herpesvirus : seul l'ORF109, codant pour une sous-unité présumée ATPase de la terminase, une enzyme d'un complexe impliqué dans le conditionnement de l'ADN viral dans les capsides, est retrouvé chez les herpesvirus (Davison et al., 2005).

e. Mécanismes d'infection de *C. gigas* par OsHV-1

L'infection des huîtres par OsHV-1 induit des mortalités importantes et rapides : les premières mortalités apparaissent entre 72h et 96h chez les huîtres infectées par cohabitation. L'infection s'accompagne d'une diminution de la nutrition, les animaux sont peu réactifs aux stimuli mécaniques et ferment difficilement leur coquille (OIE, 2018). Les larves infectées montrent une réduction des activités de nage et de nutrition (Hine et al., 1992; Nicolas et al., 1992). Les approches histologiques montrent que chez les jeunes huîtres des lésions apparaissent au niveau des tissus conjonctifs et des noyaux, où des modifications nucléaires telles que l'hypertrophie ou la pycnose associées à l'apoptose sont observées (Arzul et al., 2017; Hine et al., 1992; Nicolas et al., 1992). La pycnose définit une cellule dont le noyau apparaît réduit et très compact, ce qui reflète un état de mort cellulaire par nécrose.

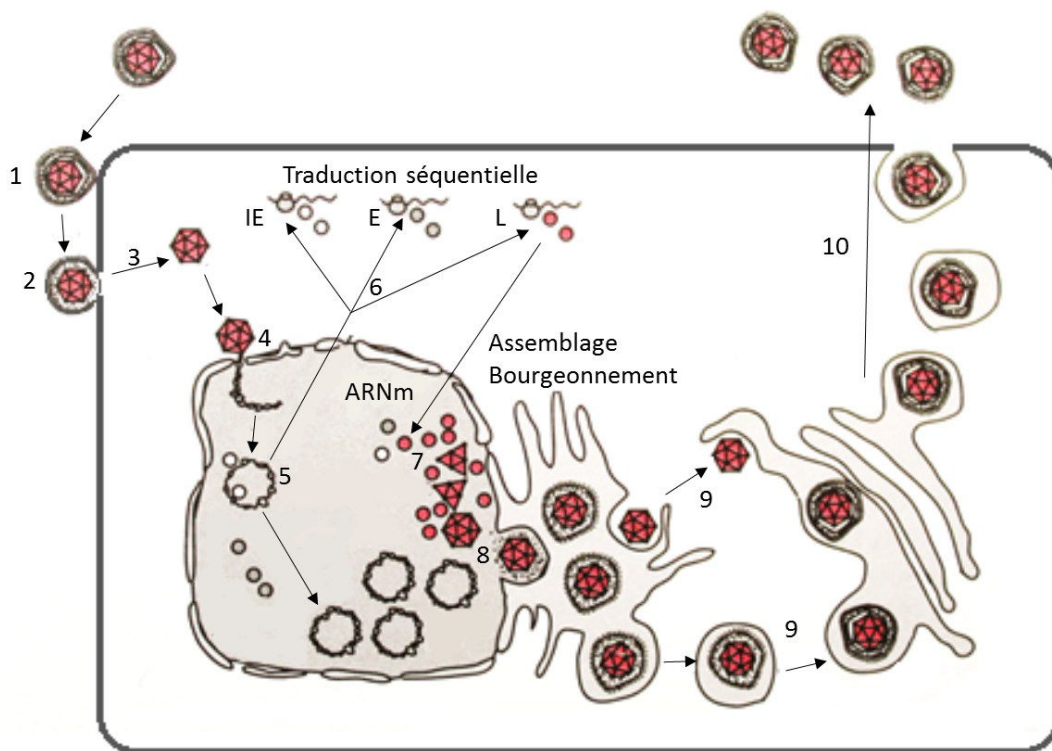


Figure 20 : Cycle de multiplication des herpès virus simplex dans une cellule permissive (Pasquier et al., 2013)

Du fait de leur état de parasite intracellulaire obligatoire, la multiplication virale ne peut avoir lieu que dans une cellule. Dans une cellule **permissive**, la réplication virale s'organise en plusieurs étapes successives (Figure 20): (1) reconnaissance et attachement du virion sur la cellule hôte et entrée du virus dans la cellule, (2) fusion avec la membrane de la cellule hôte, (3) libération du génome viral (décapsidation), (4) réplication du génome viral, (5) transcription

des gènes viraux puis (6) traduction des ARN messagers viraux, (7) maturation des protéines virales, (8) assemblage des nucléocapsides, (9) maturation des virions et enfin (10) libération des virions néoformés (Jouaux et al., 2013; Pasquier et al., 2013; Segarra, 2015).

Chez les herpesvirus, l'infection débute par la reconnaissance des glycoprotéines de l'enveloppe virale par les récepteurs de surface présents à la surface de la membrane hôte puis par leur attachement spécifique. Concernant OsHV-1, les mécanismes d'entrée ne sont actuellement pas définis chez *C. gigas*. De façon générale, les herpesvirus sont reconnus par différents récepteurs cellulaires dont les chaînes héparines sulfate appartenant aux protéoglycanes membranaires, des récepteurs de la famille de Tumor necrosis factor, tels que TNFRSF14 (Herpes virus entry mediator 14), des glycoprotéines membranaires de la famille des nectines, comme l'Herpesvirus entry mediator B, des intégrines, ou encore des membres de la famille des immunoglobulines (Spear, 2004; Spear and Longnecker, 2003). Concernant OsHV-1, des travaux suggèrent que le glypican, un protéoglycane de la famille des héparines sulfate ou des intégrines, pourrait être le récepteur cellulaire d'OsHV-1 (Jouaux et al., 2013; Renault et al., 2011; Segarra et al., 2014b).

Suite à la reconnaissance du virus et à son attachement à la membrane, l'interaction devient souvent irréversible et amorce la fusion des membranes virales et cellulaires. Immédiatement après l'entrée du virus, les protéines structurales de la capsid sont dégradées lors de l'étape de décapsidation. Le nucléoïde est ensuite libéré dans le cytoplasme. L'acheminement du matériel génétique d'OsHV-1 jusqu'aux pores nucléaires (Nuclear pore complex) semble s'effectuer grâce au cytosquelette hôte et plus précisément via les tubulines α et β (Jouaux et al., 2013) et aboutit à l'introduction du génome viral dans le noyau.

Chez l'homme, la transcription de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) s'effectue en trois phases consécutives. La phase très précoce de la transcription (IE pour Immediate early) induit la production d'ARNm codant pour des protéines nucléaires de régulation de l'expression du génome viral modulant les phases suivantes de la transcription. Dans le cas d'HSV-1, la synthèse de ces protéines atteint son maximum d'activité pendant les trois premières heures après infection (Honess and Roizman, 1974). Ensuite, la phase précoce de transcription (E pour Early) permet principalement la production d'enzymes essentielles à la réplication du génome viral comme l'ADN polymérase, des hélicases, des ribonucléases. La réplication virale se

déroule alors dans le noyau où l'ADN viral est synthétisé sous forme linéaire puis il se circularise. Survient ensuite la phase tardive du cycle lytique (L pour Late) : la transcription tardive permet la synthèse des protéines nécessaires à la structure virale et à l'assemblage des virions. Suite à leur synthèse, les protéines de la capsid s'auto-assemblent autour d'un génome circulaire et forment des nucléocapsides. Celles-ci bourgeonnent dans la membrane nucléaire puis le virion migre dans le système membranaire de l'appareil de golgi avant la libération de la particule virale par exocytose. La durée de ce cycle est variable et dépend de chaque virus : dans le cas d'une infection par HSV-1 la synthèse de l'ADN viral débute environ 3 heures après le début de l'infection (Ponce de Leon et al., 1977).

Dans le cas d'OsHV-1, des analyses réalisées par microscopie et qPCR montre que l'entrée du virus dans les tissus est très rapide et induit immédiatement la réplication virale. OsHV-1 semble cibler les hémocytes pour l'initiation de la transcription, dès une heure après injection de la suspension virale (Martenot et al., 2017; Morga et al., 2017). De plus, des approches variées telles que transcriptomiques et d'immunohistochimie sur des coupes d'huîtres infectées par injection ont mis en évidence la présence de protéines virales codées par les ORF 25, 72 et 87 (codant respectivement pour des protéines membranaires et un inhibiteur d'apoptose) principalement dans les branchies, le manteau et la glande digestive, deux heures après le début de l'infection par injection. L'expression des gènes viraux codant pour des inhibiteurs de l'apoptose (ORF42, ORF87, ORF99 and ORF106) est détectée 2 heures après le début de l'infection des huîtres par OsHV-1 (Segarra et al., 2014a). L'expression précoce de ces gènes viraux pourrait indiquer qu'OsHV-1 est capable de moduler les processus apoptotiques de l'hôte (Jouaux et al., 2013; Martenot et al., 2017; Segarra et al., 2014a). La majorité des gènes viraux sont traduits dès 18 heures après infection (Segarra et al., 2014a), et des protéines virales sont détectées dans la majorité des tissus de l'huître 28 h après infection, excepté dans les gonades (Martenot et al., 2016).

De plus, comme pour de nombreux herpes virus (Sanchez and Lagunoff, 2015), OsHV-1 module le métabolisme énergétique de l'huître dès sa réplication. En effet, la réplication d'OsHV-1 est liée à une reprogrammation métabolique de la cellule hôte qui permet de maximiser la production d'énergie et la synthèse de nouveau matériel cellulaire (lipides, protéines, nucléotides) afin d'optimiser la synthèse de virions (Corporeau et al., 2014; Young et al., 2017).

5. Mécanismes de défense contre les pathogènes chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*

L'immunité se définit comme l'aptitude de l'organisme à résister à l'invasion de virus, de bactéries, de mycètes, de parasites ou de cellules étrangères ou anormales. Cette aptitude repose sur l'ensemble des tissus, des cellules et des molécules qui concourent à opposer une résistance aux infections dans une réaction coordonnée que l'on qualifie de système immunitaire.

Historiquement, les systèmes de défense aux pathogènes ont été classés en deux catégories : les **systèmes innés** (présents chez tous les organismes) et **systèmes adaptatifs** (restreints aux vertébrés). Traditionnellement, on considérait le système immunitaire inné comme un ensemble simple de molécules et de processus permettant de défendre les cellules et les organismes contre les agents pathogènes. Selon cette définition, les systèmes innés reposaient sur des barrières chimiques, biochimiques ou mécaniques pour prévenir les attaques des agents pathogènes sans fournir de mémoire immunitaire spécifique à ceux-ci. Au contraire, les systèmes adaptatifs offraient des réponses immunitaires spécifiquement dirigées contre un pathogène, plus rapides, plus intenses et plus durables lors d'une seconde exposition à un pathogène déjà rencontré par le passé (Abbas et al., 2016). Cependant, depuis les dix dernières années un changement de paradigme a émergé estompant la frontière entre immunité innée et adaptative et laissant apparaître des nuances de la mémoire immunitaire dont certaines sont présentes chez des invertébrés (Criscitiello and de Figueiredo, 2013). Ainsi, des expositions antérieures d'arthropodes (bourdons, daphnies, copépodes) à un agent pathogène pouvaient fournir à ces organismes ou à leur descendants une protection renforcée contre des agressions ultérieures (Kurtz and Franz, 2003; Little et al., 2003; McTaggart et al., 2012; Sadd and Schmid-Hempel, 2006).

a. Réponse immunitaire innée chez C. gigas.

Chez l'huître creuse, des analyses transcriptomiques haut débit ont permis d'établir l'existence d'un système immunitaire complexe, capable de réagir à de nombreux agents pathogènes mais aussi aux stress environnementaux. La première ligne de défense est constituée par les barrières physiques et chimiques que sont la coquille, le mucus et les barrières épithéliales telles que le manteau. Le mucus recouvre les organes des bivalves peut contenir un large éventail de facteurs

antimicrobiens tels que des agglutinines ainsi que des enzymes hydrolytiques pouvant contribuer à la protection de l'hôte telles que le lysozyme et les protéases (revu par Allam and Raftos, 2015).

- *La réponse immunitaire innée à médiation cellulaire*

De nombreuses fonctions de défenses sont assurées par les hémocytes qui peuvent être localisés dans le système circulatoire, mais également infiltrés dans les différents tissus. Outre leurs implications dans la digestion et le transport des nutriments, l'excrétion, la détoxification, et la cicatrisation, ils sont capables de reconnaître et d'éliminer les pathogènes à travers plusieurs activités cellulaires (Allam and Raftos, 2015; Cheng, 1996; Feng, 1988). Les hémocytes agissent lors d'infections en coordination avec les facteurs humoraux que nous détaillerons dans le point suivant.

L'infiltration hémocytaire : Lors d'une infection ou une blessure, le nombre d'hémocytes dans le système circulatoire augmente (Allam and Raftos, 2015; Cheng, 1996; Feng, 1988). Les hémocytes sont ensuite concentrés vers le site de l'infection où ils s'agrègent entre eux pour limiter l'étendue de la lésion ou de l'infection (Feng, 1988). Au contact des hémocytes les pathogènes sont ensuite éliminés par phagocytose ou encapsulés.

La phagocytose : La phagocytose a été observée chez les huîtres lors d'infection par des virus, bactéries ou protozoaires, les hémocytes (Anderson, 1994; Renault et al., 2000). Ce processus se décompose en 5 étapes majeures décrites dans la Figure 21: le pathogène est tout d'abord reconnu par les hémocytes, c'est la reconnaissance et l'attachement. La reconnaissance du pathogène est suivie d'une extension de la membrane plasmique autour du pathogène, c'est l'internalisation par endocytose. La membrane se referme dans une vésicule membranaire, le phagosome. Le phagosome fusionne ensuite avec des lysosomes pour former un phagolysosome. Des signaux activent les enzymes du phagolysosome qui vont produire des substances toxiques telles que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui vont alors dégrader l'agent pathogène. Les mêmes substances peuvent être libérées et tuer des pathogènes dans le milieu extracellulaire.

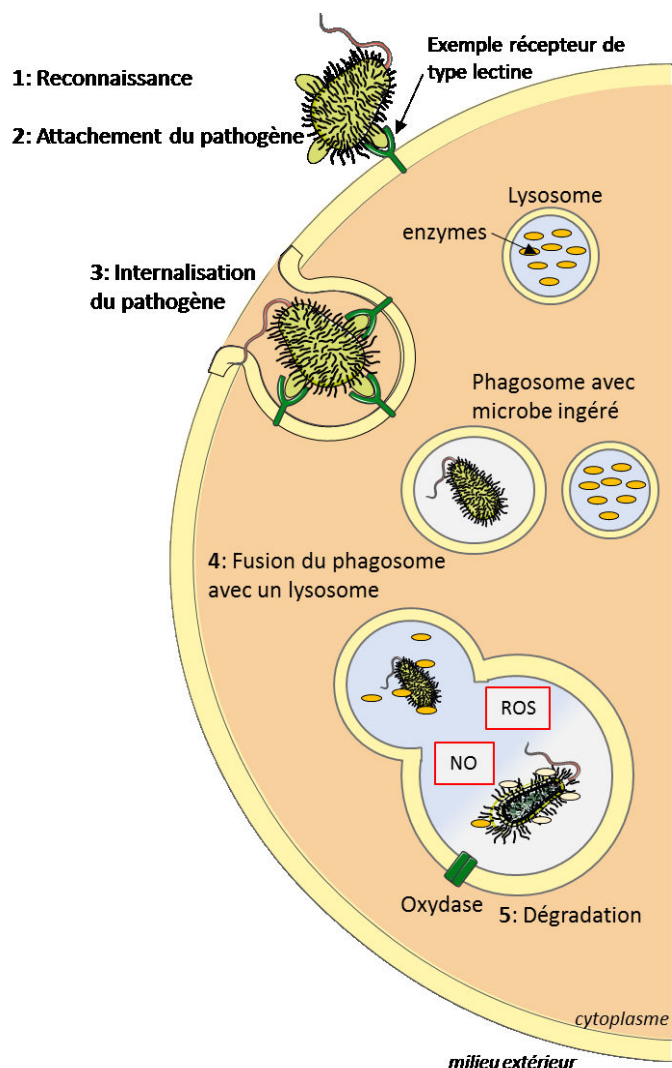


Figure 21 : Phagocytose et lyse intracellulaire des microbes

Reconnaissance des pathogènes et attachement : De nombreux processus immunitaires tels que la phagocytose ou l'expression d'effecteurs antimicrobiens par exemple sont induits par la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux agents pathogènes, les PAMPs (pathogen-associated molecular pattern), ou par la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux lésions DAMPs (damage-associated molecular pattern). Les récepteurs de l'immunité innée qui reconnaissent les PAMPs et les DAMPs sont de deux types. Ils peuvent être associés aux membranes cellulaires, ils sont alors appelés PRR pour « pattern recognition receptor » ou être

sous forme de protéine solubles, les PRPS pour « pattern recognition protein ». Les PRRs possèdent une certaine spécificité dans les motifs et les pathogènes reconnus. Parmi les PRRs on trouve principalement chez les bivalves les Toll-like (TLRs), les récepteurs de reconnaissance des peptidoglycanes (PGRPs) et les lectines.

Les TLRs sont des protéines transmembranaires comportant un domaine extracellulaire composé de nombreux motifs LRR (leucin-rich repeats) capables de lier une grande variété de PAMPs, une région transmembranaire ainsi qu'un domaine cytoplasmique Toll /IL-1R (TIR) conservé (Takeda and Akira, 2004). Environ 20 transcrits de TLRs ont été identifiés chez *C. gigas* (Zhang et al., 2011).

Les PGRPs sont des protéines ubiquitaires présentes chez la majorité des espèces animales dont *C. gigas* (Itoh and Takahashi, 2008). Elles sont impliquées dans la reconnaissance de bactéries à travers le composant majeur de la paroi cellulaire ; le peptidoglycane (Dziarski and Gupta, 2006). Les lectines sont les PRRs les plus connus chez les mollusques bivalves. Il s'agit de glycoprotéines synthétisées et secrétées par les hémocytes, capables de se lier à la surface des microorganismes, avec un large spectre de reconnaissance. Les lectines jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance des pathogènes, la transduction du signal ainsi que l'adhésion cellulaire et l'inflammation (Kilpatrick, 2002). Elles possèdent des propriétés d'agglutination et d'opsonisation qui ont été mises en évidence chez les bivalves (Chatterjee and Adhya, 2013).

Le système « interferons like » : Des gènes codant pour des senseurs d'acides nucléiques viraux ont été identifiées dans le génome de *C. gigas* (Figure 22) et sont surexprimés lors d'infection par OsHV-1 (Green et al., 2015; Wang et al., 2018). Il s'agit de membres de la famille des TLR « Toll like receptors » spécifiques des ARN viraux comme TLR3 (Fleury and Huvet, 2012; Zhang et al., 2015a), des RLR et MDA-5 (RIG-like receptors) qui identifient les ARNs produits par les virus dans le cytosol. L'engagement de ces récepteurs active différentes voies de signalisation telles que décrit dans Figure 22. L'engagement des TLR active la voie TLR/NF- κ B, tandis que la reconnaissance d'ARN viraux par RIG-1 ou MDA-5 active la voie RLRs/STING. Les gènes codant pour ces différents éléments ont été identifiés chez l'huître creuse (Fleury and Huvet, 2012; Green et al., 2015; Green and Montagnani, 2013; Guo et al., 2015; He et al., 2015; Rosani et al., 2015b). Ces voies de signalisation induisent l'expression de cytokines et de peptides antimicrobiens.

Les cytokines se lient aux récepteurs des cellules adjacentes infectées ou non et stimulent l'expression de la voie de signalisation JAK/STAT qui aboutit à l'expression d'ISG (interferons stimulating genes). Les protéines de cette voie (STING, SOC, JAK, STAT) ont été identifiées chez l'huître creuse (Green et al., 2015; He et al., 2015; Rosani et al., 2015b). Le génome de *C. gigas* code pour de nombreux ISG, tels que la viperine, IFI44, ou ADAR-L (Green et al., 2015; Renault et al., 2011; Rosani et al., 2015b; Wang et al., 2018) et sont induits en réponse à une injection de poly (I:C) (Green and Montagnani, 2013). Chez les vertébrés, l'expression des ISG conduit à l'induction d'un état antiviral avec l'activation d'enzymes dégradant l'ARN viral, inhibant l'expression des gènes viraux, l'assemblage des virions, et la synthèse protéique.

Du fait de l'absence de lignées cellulaires chez *C. gigas*, la caractérisation fonctionnelle de ces molécules est complexe. Grâce à des modèles hétérologues tels que des cellules de mammifères de la lignée cellulaire Vero (African green monkey kidney) infectées par l'HSV-1, l'activité antivirale de l'hémolymph de *C. gigas* a pu être démontrée contre HSV-1. Cette activité semble correspondre à l'expression de la cavortine, qui est une des protéines majoritaires de l'hémolymph et qui contient un domaine superoxyde dismutase (Gonzalez et al., 2005; Itoh et al., 2011; Scotti et al., 2007) ; elle pourrait interférer avec la réplication virale (Green et al., 2014b).

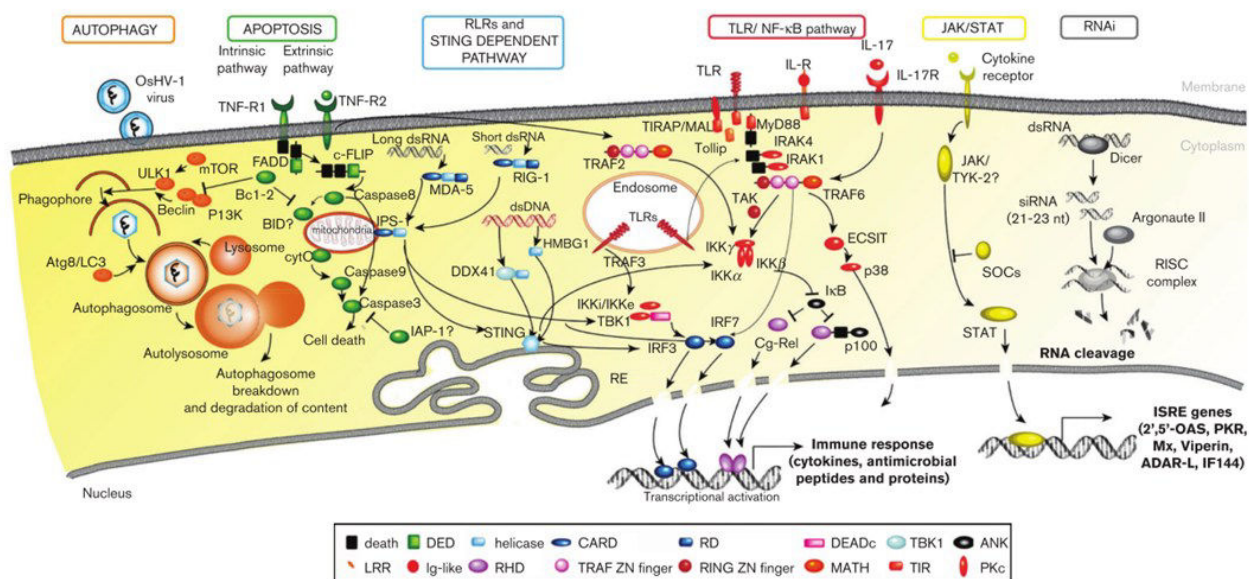


Figure 22: Réponses antivirales chez l'huître creuse déduites à partir de séquences identifiées dans le génome de *C. gigas* et des systèmes antiviraux connus des insectes et des vertébrés. TIR, Toll/IL1 receptor; Ig, immunoglobulin; DD, death domain; LRR, leucine rich repeat; TM, transmembrane; PKc, protein kinase c; RHD, rel homology domain; IPT, immunoglobulin-like fold; RING, RING-finger (really interesting new gene) domain; zf-TRAF, TRAF type zinc finger; MAT, meprin and TRAF-C homology domain; UBL-TBK1-like, ubiquitin-like domain of human Tbk1 and similar proteins (Green et al., 2015).

L'encapsulation : L'encapsulation est une réponse immunitaire majeure observée chez de nombreux invertébrés tels que la palourde (Montes et al., 1995; Smolowitz et al., 1998). Elle survient lorsque les particules ou les pathogènes sont de taille trop importante pour être phagocytés, ils sont encapsulés. Ce processus se traduit par le regroupement de cellules hématocytaires qui s'organisent en couches concentriques afin de former une capsule fine autour du pathogène. La structure ainsi formée est mélanisée par l'activité de la phenoloxydase présente à la surface des hémocyte. Finalement la destruction du pathogène survient suite à l'activité des enzymes lysosomales et la génération de ERO par les hémocytes.

La mort cellulaire programmée : L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, régule la destinée cellulaire aussi bien dans un contexte physiologique (contrôle de la population de cellules,

renouvellement cellulaire, destruction de structures temporaires lors de l'embryogénèse, ou élimination de cellules superflues) que dans un contexte pathologique (pour éliminer les cellules indésirables telles que les cellules tumorales, infectées par un virus, ou les cellules présentant des dommages irréversibles de l'ADN). Des études ont pu montrer l'importance de l'apoptose dans le fonctionnement immunitaire des mollusques limitant la propagation de l'agent pathogène et les dommages inflammatoires des tissus environnants (He et al., 2015; Martenot et al., 2017; Wang et al., 2018). L'apoptose est modulée par des signaux extra et intracellulaires (Figure 23). La voie extrinsèque de l'apoptose est déclenchée à la surface cellulaire par la liaison de ligands de type TNF (tumor necrosis factor) ou FAS à leurs récepteurs qui, par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice FADD, active les caspases (protéines clés de l'apoptose) initiateurs de l'apoptose (Caspase 8 et 10) et qui déclenchent le processus de mort cellulaire. Cette activation est également rétrocontrôlée par la voie NF- κ B.

La voie intrinsèque de l'apoptose est mitochondriale : dans cette voie, c'est la libération du cytochrome C par la mitochondrie qui active l'apoptose cellulaire. Cette libération est contrôlée par de nombreux gènes tels que Bcl-2 et Bcl-XL et est souvent déclenchée par un stress génotoxique (lésions de l'ADN) ou un stress oxydatif. La libération du cytochrome C déclenche la cascade des caspases en se liant à la protéine adaptatrice Apaf1 et en favorisant la formation d'un apoptosome, structure capable de recruter la procaspase 9 et de l'activer. Il existe dans la famille des Bcl des protéines favorisant l'apoptose (Bad, Bak, Bax, et Bid) et d'autres inhibant l'apoptose telles que Bcl-2. L'équilibre instable entre ces protéines est déplacé par un stress vers l'apoptose.

Chez *C. gigas*, les gènes codant pour la machinerie apoptotique semblent très conservés (Zhang et al., 2012). Le génome de *C. gigas* code pour 48 gènes inhibiteurs de l'apoptose (Zhang et al., 2012) et des transcrits tels que TNF ou la caspase 3 sont surexprimés en réponse à une infection par OsHV-1 chez des huîtres sensibles à l'infection virale, suggérant l'implication de ces processus dans la réponse antivirale (de Lorgeril et al., 2018).

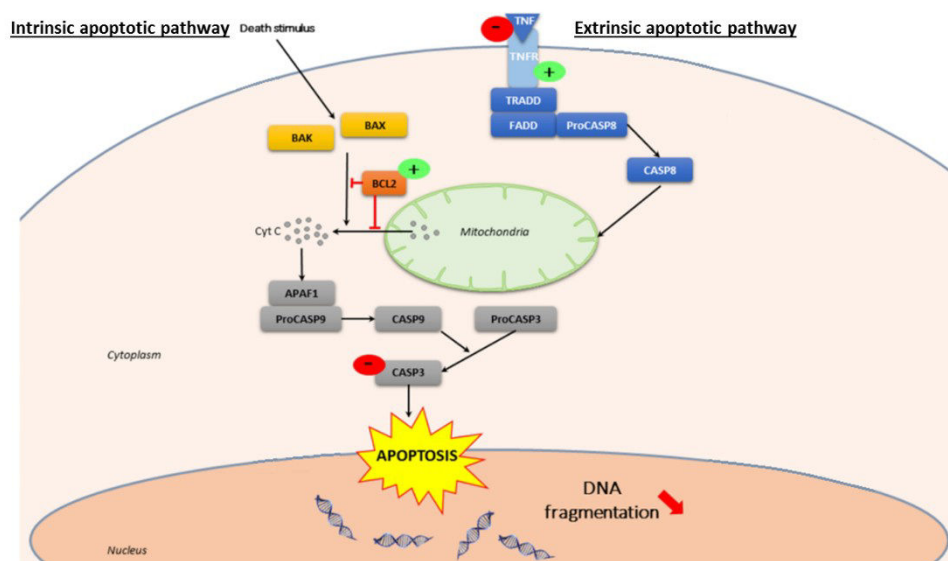


Figure 23 : Voies de signalisation régulant l'apoptose (Martenot et al., 2017)

L'autophagie est un autre processus de la mort cellulaire programmée : elle permet de maintenir l'homéostasie cellulaire et constitue un des mécanismes de renouvellement des organites cytoplasmiques. Des travaux ont montré que ce processus est impliqué dans les mécanismes de l'immunité innée et semble capable de sélectionner des cibles comme des pathogènes intracellulaires pour induire leur dégradation enzymatique. Chez les vertébrés, des senseurs d'ARN viraux comme TLR3 ou TLR8 sont connus pour induire l'autophagie (Richetta and Faure, 2013). Chez *C. gigas*, l'autophagie est induite en réponse à l'infection par OsHV-1 et semble avoir un effet protecteur sur l'hôte (Moreau et al., 2015).

- *La réponse immunitaire innée à médiation humorale*

Chez les bivalves, l'immunité à médiation humorale repose sur plusieurs molécules biologiquement présentes dans l'hémolymphe. Ces molécules actives sont classées selon deux catégories : les biomolécules sérologiquement actives (opsonines, lysines, agglutines, facteurs antimicrobiens, lysozymes) et les enzymes d'origine lysosomale (aminopeptidases, β -

glucuronidases, acide phosphatase, alcaline phosphatase, α -mannosidase, estérases et peroxydases).

Le système pro-phénoloxydase/phénoloxydase (proPO) : Il joue un rôle crucial dans l'immunité innée chez les invertébrés, il est à l'origine de la production de mélanine. La cascade de réaction est activée suite à des stimulations de stress cellulaire ou en présence de microorganismes et intervient en appui aux réactions de phagocytose et d'encapsulation (Cerenius and Söderhäll, 2004; Hellio et al., 2007). Chez *C. gigas*, la PO est présente sous forme inactive, la proPO. La pro-protéine est clivée par une sérine protéase endogène puis sous sa forme active, la PO catalyse la réaction de conversion de phénol en quinones, qui forment par polymérisation la mélanine. Les composés intermédiaires de cette réaction sont bactéricides et interviennent dans les phénomènes de reconnaissance du non-soi (Cerenius and Söderhäll, 2004). Des travaux ont mis en évidence des activités PO présentes dans les hémocytes chez *C. gigas* (Hellio et al., 2007), qui exercent un effet antibactérien sur les bactéries pathogènes de *C. gigas* (Luna-Acosta et al., 2010).

Les enzymes hydrolytiques : Chez *C. gigas*, les enzymes telles que les phosphatases alcalines et les lysozymes ont été identifiées (Itoh et al., 2007; Wang et al., 2018). Elles sont impliquées dans la dégradation des organismes pathogènes dans les cellules ou dans l'hémolymph (Xue and Renault, 2000). Elles sont induites suite à une exposition aux bactéries ou à leurs composants structuraux.

Les inhibiteurs de protéases : Il s'agit de protéines régulant l'activité catalytique des catalases. Ils permettent d'éviter l'activation excessive de cascades protéolytiques endogènes (sérines protéases) intervenant dans l'activation du système proPO et induisant des dommages cellulaires. Ils peuvent inhiber des protéases qui permettent aux agents pathogènes de pénétrer pour se multiplier au sein de l'hôte. Le génome de *C. gigas* contient des gènes codant des protéines de type α -2-macroglobuline, des serpins et des TIMP (Tissue inhibitor of metalloproteinase) (Gueguen et al., 2003; Montagnani et al., 2001).

Les peptides antimicrobiens et les molécules cytotoxiques, antivirales : Il s'agit d'effecteurs essentiels de la défense immunitaire chez les bivalves marins. Présents chez la majorité des organismes, ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions immunitaires telles que la

destruction des microorganismes (Boman, 1995). Ils sont synthétisés dans les granulocytes même en absence de menace mais la présence de pathogènes induit l'augmentation de leur concentration dans l'hémolymphe (Mitta et al., 1999). 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., 2000a, 2000b). 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 mytimycines et les défensines. Chez *C. gigas*, la purification des peptides antimicrobiens conduite sur l'hémolymphe a permis l'identification d'un peptide dont la structure de type antibiotique (bloquant la croissance des bactéries) laisse présager une origine bactérienne (Defer et al., 2013). Un peptide antimicrobien de type défensine a également été identifié chez *C. gigas* (Gueguen et al., 2009, 2006). Des travaux rapportent une activité antivirale contre le virus de la mosaïque du tabac (VMT) dans des extraits d'huître creuse (Olicard et al., 2005), et démontrent également un effet antiviral de l'hémolymphe de *C. gigas* sur le virus HSV-1 et NPI (Necrose pancreatic infection, Olicard et al., 2005)).

Les enzymes antioxydantes : Des espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites en continu lors du fonctionnement du métabolisme aérobie. Non prises en charge, les ROS sont particulièrement nocives pour les organismes et peuvent induire un stress oxydatif et des dommages au niveau de macromolécules essentielles au fonctionnement cellulaire (ADN, protéines, lipides) (Storey, 1996). Pour limiter le stress oxydant, les organismes possèdent différentes enzymes de détoxification. La superoxyde dismutase (SOD) transforme l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) lui-même décomposé en H_2O et O_2 par la catalase (CAT) ou par les glutathions peroxydases (GPx) et la thiorédoxine peroxydase (TrxP). La glutathion-S-transférase (GST) est impliquée dans les processus de détoxification des xénobiotiques et le piégeage des peroxydes lipidiques (Migdal and Serres, 2011). La Figure 24 résume l'ensemble des voies impliquées dans la production et l'élimination des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ERA) mises en évidence dans les hémocytes de bivalves (Gu et al., 2016).

Par leur effet bactéricide, les ERO et les ERA sont aussi impliquées dans l'élimination des agents pathogènes (Migdal and Serres, 2011) comme par exemple au cours de la phagocytose (Figure 24). Chez les invertébrés marins, des espèces réactives de l'azote telles que l'oxyde nitrique ($\bullet\text{NO}$) sont produites à partir de l'oxyde nitrique synthase (iNOS), en réponse aux pathogènes (Donaghy et al., 2015; Gu et al., 2016).

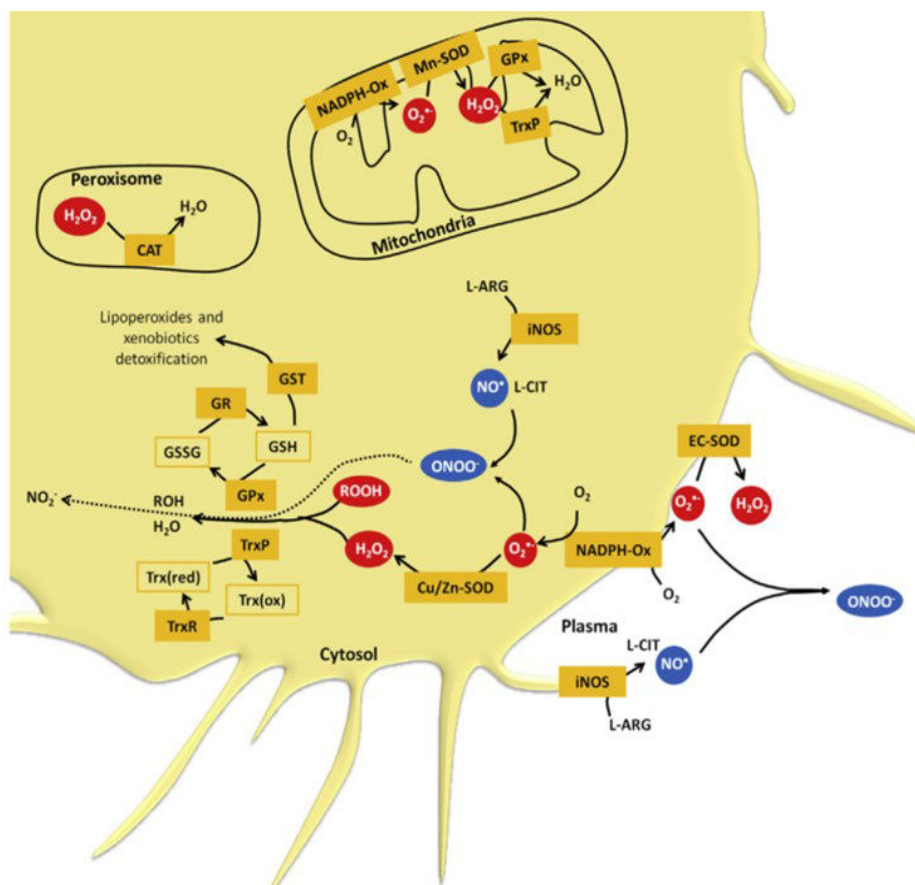


Figure 24 : Enzymes du système antioxydant impliquées dans la production et la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (en rouge) ou de l'azote (en bleu) présents dans les hémocytes, le compartiment intracellulaire (mitochondrie, peroxysome, cytoplasme) et extracellulaire chez les bivalves (Richard et al., 2016).

Les protéines de stress : Les HSP (Heat shock protein) sont surexprimées en réponse à un stress biotique ou abiotique et interviennent dans la réparation des lésions et les infections. Des travaux ont récemment montré que l'expression des transcrits codants l'HSP70 étaient augmentés en réponse à OsHV-1 : les auteurs suggèrent leur possible implication dans les processus de l'immunité innée antivirale (De la Re Vega et al., 2017).

b. Une mémoire immunitaire chez l'huître creuse ?

- Amorçage immunitaire « immune priming »

Le terme de **priming immunitaire** fait référence à l'observation d'une réponse immunitaire accrue lors d'une seconde rencontre d'un organisme avec un pathogène (Little and Kraaijeveld, 2004). Il pourrait alors se définir comme la capacité d'un système immunitaire à stocker ou simplement utiliser les informations sur un antigène ou un parasite précédemment rencontré, lors d'une exposition secondaire (Milutinović and Kurtz, 2016). Ce phénomène a été observé chez plusieurs mollusques bivalves tels que *Chlamys farreri* ou *Crassostrea gigas*.

La survie des pétoncles exposés à *Vibrio anguillarum* est améliorée lorsque les bivalves avaient déjà été exposés à cette bactérie dans l'eau de mer et après plusieurs expositions à ce même pathogène, l'activité phagocytaire était augmentée (Cong et al., 2008).

L'amorçage immunitaire a aussi été mis en évidence chez l'huître creuse. Une stimulation primaire d'huîtres par leur exposition à une souche de *Vibrio splendidus* désactivée a provoqué une augmentation du nombre total d'hémocytes circulants, de leur régénération ainsi qu'une phagocytose accrue lors d'une seconde exposition à *V. splendidus* (Zhang et al., 2014).

Le poly I:C, acide polyinosinique-polycytidylique est un ARN double brin synthétique structuellement semblable à l'ARN de certains virus et capable de susciter une réponse immunitaire en stimulant une infection virale. Une injection de poly I:C stimule un état antiviral chez *C. gigas*. Lorsque des huîtres sont exposées à OsHV-1 vingt-quatre heures après l'injection de poly I:C, la proportion d'huîtres positives au virus est significativement réduite. L'acquisition de cet état antiviral semble persister et protéger les huîtres à long terme (5 mois) contre une infection en milieu naturel (Lafont et al., 2017). Cependant, le poly I:C stimule une réponse immunitaire spécifiquement antivirale (Green and Montagnani, 2013) et ne parvient pas à protéger les huîtres contre une bactérie pathogène telle que *Vibrio tasmaniensis* (Lafont et al., 2017). Green et collaborateurs ont aussi mis en évidence que la descendance (larve D-veligeres) issues de parents traités avec du poly I:C avait deux fois plus de chance de survivre à l'exposition à OsHV-1 par rapport aux témoins. Ces larves exprimaient plus fortement des ARNs codant IRF2, un facteur clé de l'immunité antivirale (Green et al., 2016).

Ainsi ces travaux mettent en évidence l'existence de stimulation immunitaire innée et de la mémoire chez *C. gigas*. La stimulation immunitaire par injection de poly I:C induit une protection antivirale contre OsHV-1, à long terme et transmissible à la descendance.

6. Effets de la température sur l'interaction *C. gigas*-OsHV-1

Dès les premiers signalements en 1970, les mortalités d'huîtres creuses ont été associées à des variations de la température de l'eau de mer. Ces épisodes de mortalités survenaient dès que la température de l'eau dépasse les 19°C et sont alors qualifiés de mortalités estivales (Samain and McCombie, 2008). La température n'est cependant pas le seul facteur de risque : la survenue des mortalités estivales coïncide aussi avec la période de l'année où les réserves énergétiques de l'huître sont au plus bas et où la demande en énergie et l'effort reproductif sont les plus importants (Berthelin et al., 2000; Samain and McCombie, 2008).

A partir des années 2008, les mortalités massives causées par OsHV-1 μ Var surviennent du printemps à l'automne après une augmentation marquée de la température moyenne de l'eau de mer (Garcia et al., 2011) en France, en Irlande et en Australie (Clegg et al., 2014; Paul-Pont et al., 2014; Pernet et al., 2012; Renault et al., 2014).

En France, ces épisodes sont enregistrés dès que la température de l'eau de mer atteint le seuil minimal de 16°C à 17°C (EFSA, 2010; Pernet et al., 2012; Renault et al., 2014). Au cours d'une année, OsHV-1 est généralement détecté en premier dans le sud de la France, où les températures sont plus élevées, puis la détection suit un gradient Sud/Nord avec l'augmentation progressive des températures sur les côtes françaises (EFSA, 2010; Garcia et al., 2011). En 2009, une étude réalisée dans la lagune de Thau montre que les mortalités d'huîtres creuses se produisent systématiquement lorsque la température de l'eau est comprise entre 17°C et 24°C, quels que soient l'âge des huîtres et la date de déploiement, définissant ainsi la température maximale de survenue des mortalités à 24°C (Pernet et al., 2012).

Lorsque des huîtres donneuses infectées en milieu naturel sont placées en cohabitation avec des huîtres saines, la transmission virale d'OsHV-1 est optimale à des températures comprises entre

16°C et 22°C. Au-delà de cette fourchette, la transmission virale et les mortalités associées sont significativement réduites (Pernet et al., 2012; Petton et al., 2013).

En dessous de 13°C, la transmission du virus semble nulle, et OsHV-1 n'est plus détecté après 40 jours à ces températures, suggérant que les faibles températures pourraient offrir une voie de limitation de l'infection virale (Petton et al., 2013). Des travaux complémentaires montrent qu'à faible température, l'ADN d'OsHV-1 persiste dans les huîtres malgré l'absence de mortalité, et qu'après élévation de la température à 21°C le virus peut être réactivé (Pernet et al., 2015, 2013).

Lorsque des huîtres infectées (soit préalablement en milieu naturel soit par injection intramusculaire) sont placées à des températures supérieures à 21°C, les mortalités sont plus importantes et plus précoces (De Kantzow et al., 2016; Petton et al., 2013). Ces résultats suggèrent que la réplication virale a pu être augmentée avec l'augmentation de la température (Petton et al., 2013). Au contraire, lorsque les huîtres sont préalablement acclimatées à des températures supérieures à 21°C avant d'être infectées (par cohabitation), les mortalités sont réduites si l'on augmente la température, avec réduction de l'ADN viral dans les animaux après deux jours de cohabitation, suggérant une augmentation des fonctions antivirales.

Peu de données concernent la persistance d'OsHV-1 à des températures supérieures à 21°C, mais il semble qu'OsHV-1 persiste sans modification de sa virulence à 25°C (Martenot et al., 2015). Cependant, la stabilité du virus apparaît réduite dans le temps à 25°C, puisque OsHV-1 n'est plus infectieux après 33h (contre 72h à 16°C).

IV. Objectifs de thèse

Face aux défis imposés par l'émergence de pathogènes en milieu marin et la récurrence des épisodes de mortalités d'huîtres creuses associées à OsHV-1, il paraît important d'identifier des méthodes « curatives ». Les modulations des paramètres environnementaux semblent correspondre à une stratégie prometteuse dans la régulation des maladies.

Plusieurs études démontrent effectivement que la température influence le risque de mortalité des huîtres. La transmission d'OsHV-1 est optimale entre 16 et 24°C, et les températures inférieures à 16°C ralentissent la survenue des mortalités d'huîtres mais ne les empêchent pas. Au-delà de 24°C, l'effet de la température demeure ambigu. Définir les mécanismes sous-jacents à la réduction des mortalités d'huîtres à hautes températures sont des enjeux cruciaux dans le développement de mesures de contrôle d'OsHV-1 en aquaculture. Les hautes températures semblent réduire les mortalités et l'ADN viral dans les huîtres lorsqu'elles sont préalablement acclimatées à ces hautes températures avant l'infection. Cependant, on ignore actuellement les mécanismes mis en jeu par la température : soit la température affecte *Crassostrea gigas* en modifiant sa sensibilité au virus, soit la température agit sur l'agent pathogène pour moduler sa pathogénicité, soit elle joue sur les deux plans. Il est également indispensable de savoir si les huîtres ayant survécu à l'infection virale par une action de la température seront encore capables ou non de transmettre OsHV-1 à des huîtres saines, et si elles restent protégées de l'infection de façon durable.

Mon objectif de thèse est d'étudier l'effet des hautes températures sur l'interaction OsHV-1/*C. gigas*. Pour cela, deux températures sont testées et comparées à la température contrôle pour l'infection de 21°C. Les températures testées sont 26°C, dont l'effet sur l'interaction OsHV-1/*C. gigas* reste ambigu, et 29°C, qui selon les données actuelles semble améliorer la survie des huîtres infectées. Ces températures sont dans la gamme de tolérance de l'huître car sa filtration est maintenue jusqu'à environ 32°C/33°C. La température de 21°C est choisie comme condition contrôle car c'est la température favorable à la réplication et à la transmission d'OsHV-1 et proche de la température optimale pour la croissance et la reproduction des huîtres.

Pour mon travail de thèse, nous avons choisi de réaliser les infections virales par la méthode d'infection par cohabitation. Nous analysons les mécanismes dans les huîtres receveuses, qui

sont celles placées en cohabitation avec les huîtres donneuses préalablement infectées par injection intramusculaire avec une suspension virale d'OsHV-1. La méthode de cohabitation permet de reproduire la voie d'entrée naturelle des pathogènes. Les animaux utilisés sont des NSI (Naissains standardisés Ifremer) produits en conditions de laboratoire et n'ayant jamais été au contact du virus OsHV-1. Ils sont âgés de 8 mois lors de l'expérience et représentent parfaitement la population de jeunes huîtres touchées lors des épisodes de mortalités en milieu naturel.

Première partie de la thèse : Comment agissent les hautes températures sur l'interaction *C. gigas*-OsHV1 ?.

Le premier chapitre de ma thèse vise à identifier si les hautes températures modulent la sensibilité de l'huître creuse à l'infection virale, ou si elles modifient la persistance d'OsHV-1, ou si elles ont cette double action. Nous avons ensuite analysé l'impact des hautes températures sur la persistance d'OsHV-1 et les possibilités de réactivation et de transmission virale des huîtres ayant survécu à une infection à hautes températures. Finalement, nous avons mesuré la sensibilité à long terme en milieu naturel des huîtres ayant survécu à une infection virale à hautes températures.

Pour répondre à ces objectifs, nous présentons une expérimentation réalisée en 3 phases.

Phase 1 : Trois traitements sont appliqués à la suspension virale utilisée pour l'injection des huîtres donneuses. Cette suspension d'OsHV-1 est incubée soit à 21°C, 26°C ou 29°C avant injection dans les donneuses. Puis chaque série de donneuses a été placée en cohabitation avec des huîtres saines (receveurs) à trois températures (21°C, 26°C ou 29°C) selon un plan factoriel fractionnaire.

Phase 2 : Les huîtres receveuses sont suivies pour leur survie pendant 14 jours et sont échantillonnées pour la quantification de l'ADN d'OsHV-1 et l'expression de quelques gènes viraux.

Phase 3 : Les huîtres receveuses survivantes ont ensuite toutes été placées à 21°C pour évaluer le potentiel de réactivation du virus, avant d'être transférées dans des fermes ostréicoles pour évaluer leur sensibilité à long terme à la maladie en milieu naturel.

Seconde partie de la thèse : Quels sont les mécanismes qui expliquent l'impact des hautes températures sur l'interaction *C. gigas*-OsHV1 ?

Le second chapitre de ma thèse est consacré à l'étude des mécanismes induits chez l'huître creuse en réponse à une infection par OsHV-1 à hautes températures. Nous avons comparé les mécanismes moléculaires mis en jeu chez les huîtres receveuses à 29°C et 21°C de l'expérimentation présentée dans la partie précédente. Nous avons analysé les réponses transcriptomiques des huîtres receveuses ainsi que les modifications de leur composition lipidique.