

Université de La Rochelle
Technoforum
23 avenue Albert Einstein
17 000 La Rochelle

Ifremer
Laboratoire de Génétique et Pathologie
Avenue de Mus de Loup
17 390 La Tremblade

Thèse de Doctorat de l'Université de La Rochelle
École Doctorale des Sciences pour l'Environnement Gay-Lussac (GL)

Présentée par Sophie DE DECKER
Pour l'obtention du titre de Docteur en Biologie

Sujet de la thèse

**Approches multifactorielles pour l'étude d'interactions entre
l'huître creuse *Crassostrea gigas* et
deux *Vibrio* pathogènes, *V. splendidus* et *V. aestuarianus* :
épidémiologie, variabilité de la sensibilité de l'hôte et
pathogénèse.**

Soutenue le 28 septembre 2010

Composition du jury

Dr Pierre Boudry	Ifremer	<i>Directeur de thèse</i>
Dr Denis Saulnier	Ifremer	<i>Responsable scientifique</i>
Dr Christian Michel	INRA	<i>Rapporteur</i>
Dr Christine Paillard	CNRS	<i>Rapporteur</i>
Pr Paco Bustamante	Université de La Rochelle	<i>Examineur</i>
Dr Jean-Michel Escoubas	INRA	<i>Examineur</i>

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements à l'Ifremer pour avoir financé cette thèse.

J'adresse également mes remerciements à Jean Prou pour m'avoir accueillie à la station Ifremer de La Tremblade et à Tristan Renault pour m'avoir accueillie dans le Laboratoire de Génétique et Pathologie.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au Professeur Paco Bustamante pour avoir accepté de présider ce jury de thèse. Je remercie les Docteurs Christian Michel et Christine Paillard pour avoir accepté d'en être les rapporteurs, et également le Docteur Jean-Michel Escoubas pour avoir examiné ce travail avec soin.

Un grand merci à Pierre Boudry, qui a dirigé cette thèse, et à Denis Saulnier, qui en a été le responsable scientifique : merci à tous les deux pour m'avoir accompagnée tout au long de cette thèse. Merci pour tout ce qu'ils m'ont apporté.

Un merci spécial à Philippe Haffner qui m'a été d'un grand soutien au cours de ces trois années. Un merci particulier également à Nicole, Véronique, Florence et Martine. Merci à l'ensemble du personnel de la station de La Tremblade qui a participé de près ou de loin à ce travail.

Je remercie également l'ensemble du personnel du Laboratoire de Physiologie des Invertébrés (Ifremer, Brest) pour m'avoir chaleureusement accueillie au cours de la dernière phase de cette thèse.

Et bien sûr et surtout, merci à mes amis, à ma famille.

La terre est bleue comme une orange
Jamais une erreur les mots ne mentent pas
Ils ne vous donnent plus à chanter
Au tour des baisers de s'entendre
Les fous et les amours
Elle sa bouche d'alliance
Tous les secrets tous les sourires
Et quels vêtements d'indulgence
À la croire toute nue.

Les guêpes fleurissent vert
L'aube se passe autour du cou
Un collier de fenêtres
Des ailes couvrent les feuilles
Tu as toutes les joies solaires
Tout le soleil sur la terre
Sur les chemins de ta beauté.

Paul Eluard, 1929

INTRODUCTION GENERALE	3
1 Aquaculture et maladies	3
2 Ostréiculture et mortalités estivales	23
CONTEXTE SCIENTIFIQUE	37
1 L’huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	37
2 Les bactéries du genre <i>Vibrio</i>	63
OBJECTIFS et APPROCHES DEVELOPPEES	94
CHAPITRE 1	97
<i>V. splendidus</i> et <i>V. aestuarianus</i> :	
Epidémiologie et virulence, outils de détection et de quantification	
1 Article 1 :	99
A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster <i>Crassostrea gigas</i> and correlation between virulence and metalloprotease-like activity.	
2 Article 2 :	139
Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of <i>Vibrio aestuarianus</i> in oyster and seawater: a useful tool for epidemiologic studies.	
3 Résultats annexes :	160
Synergie, métalloprotéases et quorum sensing.	
CHAPITRE 2	185
Facteurs de sensibilité de l’huître creuse à une vibriose expérimentale :	
Gamétogenèse, ploïdie et composante génétique.	
1 Article 3 :	189
Responses of diploid and triploid Pacific oysters <i>Crassostrea gigas</i> to <i>Vibrio</i> challenge in relation to their reproductive status.	
2 Résultats annexes :	231
Résistance et Génétique.	
CHAPITRE 3	249
Interactions <i>Vibrio</i>-Huître :	
Etude de la pathogenèse par cohabitation expérimentale.	
1 Introduction et résultats préliminaires	251
2 Article 4 :	259
Evidence of an immediate but short term response of <i>Crassostrea gigas</i> oyster induced by virulent or avirulent <i>Vibrio</i> bacteria.	
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	295
ANNEXES	305
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	339

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Tendances dans la production aquacole mondiale de 1970 à 2006 : principaux groupes d'espèces. (FAO, 2009).....	4
Figure 2 : Représentation de l'interaction complexe entre l'hôte, son environnement et l'agent pathogène, menant à l'expression (en rouge) d'une maladie multifactorielle (Snieszko, 1973; Lightner et Redman, 1998; Lemonnier, 2007).	6
Figure 3 : Représentation schématique listant de façon non exhaustive différentes stratégies visant la prévention et le contrôle des maladies infectieuses en aquaculture.....	21
Figure 4 : Production aquacole mondiale (en quantité) : principaux groupes d'espèces en 2006 (FAO, 2009).....	23
Figure 5 : Répartition de la production de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> sur les sites d'élevage français en 2006 (données du Centre National de Conchyliculture).	24
Figure 6 : Espèces d'huîtres produites en France au cours du XX ^{ème} siècle (Gouletquer, et al., 1998).	25
Figure 7 : Taux de mortalités des huîtres de 1 an et de 2 ans le long du littoral français entre 1995 et 2004 (1 an) et 1993 et 2004 (2 ans) (Soletchnik, et al., 2007).....	29
Figure 8 : Etiologie multifactorielle du phénomène de mortalités estivales d'huîtres creuses en France (Samain et McCombie, 2008).....	30
Figure 9 : Mortalités moyennes (\pm écartype) observées sur différents lots issus de la troisième génération des familles sélectionnées pour leur « faible » (histogrammes noirs) ou leur « forte » (histogrammes rayés) capacité de survie aux mortalités estivales (Dégremont, et al., 2010).	31
Figure 10 : Anatomie de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> (illustration de J. Normand).....	39
Figure 11 : Organisation du système circulatoire chez <i>Crassostrea gigas</i> (Bachère, et al., 2004).	39
Figure 12 : Cycle biologique de l'huître creuse (Normand, 2009).....	41
Figure 13 : Schéma de la fécondation et de la ségrégation chromosomique, lors d'un croisement $2n \times 2n$ (A), lorsqu'un traitement chimique est appliqué pour l'obtention d'embryons triploïdes par rétention du 2 ^{ème} globule polaire (B), du 1 ^{er} globule polaire (C), lors d'un croisement $2n \times 4n$ (D) (Normand, 2009).....	46
Figure 14 : Différents types hémocytaires chez <i>Crassostrea gigas</i> (Microscopie Electronique à Transmission) : A : Hyalinocyte ; B : Granulocyte (Bachère, et al., 2004).....	50
Figure 15 : Schéma d'une voie de signalisation Rel/ NF- κ B chez l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> proposé par Montagnani (2002).....	52
Figure 16 : Représentation schématique du processus de phagocytose et des processus de dégradation des particules phagocytées (Paillard, 2004).....	53
Figure 17 : Représentation des processus de dégradation intracellulaire intervenant après phagocytose d'une particule étrangère par les hémocytes (d'après Delaporte, 2005).....	55
Figure 18 : Schéma du système d'activation de la prophénoloxydase chez les insectes (Dziarski, 2004).	57
Figure 19 : Modèle d'implication de <i>Cg</i> -TIMP dans les réactions de défense de <i>Crassostrea gigas</i> proposé par Montagnani (2002).....	58

Figure 20 : Analyse MLST (MultiLocus Sequence Typing) sur 9 gènes de 58 souches de bactéries du genre <i>Vibrio</i> (<i>ftsZ</i> , <i>gapA</i> , <i>gyrB</i> , <i>pyrH</i> , <i>recA</i> , <i>topA</i> et ARNr 16S) (Thompson, et al., 2007).	66
Figure 21 : Courbe de base du « Damage-response framework » décrite par Casadevall et Pirofski (2003a).	72
Figure 22 : Dynamique des génomes bactériens (Pallen et Wren, 2007).	74
Figure 23 : Les trois grands mécanismes de transferts horizontaux de gènes chez les bactéries (Furuya et Lowy, 2006).	75
Figure 24 : A. Flagelle polaire unique chez <i>V. cholerae</i> (MEB), B. Flagelles multiples chez <i>V. fisheri</i> (MET) et C. Flagelles latéraux multiples chez <i>V. parahaemolyticus</i> (MET).	77
Figure 25 : Ultrastructure du flagelle bactérien de bactérie Gram négatif (Yorimitsu et Homma, 2001).	78
Figure 26 : Description du rôle du TCP (Toxin coregulated pilus) de <i>V. cholerae</i> , un exemple de pilus de type IV (Donnenberg, 2000).	80
Figure 27 : Les multiples fonctions des protéases bactériennes dans le processus d'infection (Travis, et al., 1995).	82
Figure 28 : Mécanismes d'acquisition du fer par les sidérophores chez les bactéries Gram négatif (Wandersman et Delepelaire, 2004; Binesse, 2008).	83
Figure 29 : Mode d'action de la toxine cholérique CT (Reynaud, 2008).	85
Figure 30 : Représentation schématique du système de sécrétion de type III (SSTT) (Hueck, 1998; Reynaud, 2008).	87
Figure 31 : Structure des LPS et de la capsule des sérogroupes O1 et O139 de <i>V. cholerae</i> .	88
Figure 32 : Schéma générique du quorum sensing (Keller et Surette, 2006).	92
Figure 33 : Description des trois voies du quorum sensing décrites chez <i>V. harveyi</i> (Waters et Bassler, 2005).	93
Figure 34 : Schéma représentant la préparation des cultures bactériennes pures et des échantillons pour la quantification des bactéries (encadré rouge) et pour la mesure de l'activité métalloprotéase (encadré jaune).	164
Figure 35 : Protocole de mesure de l'activité métalloprotéase dans les surnageants de culture.	167
Figure 36 : Cinétiques de croissance de <i>V. splendidus</i> LGP32-GFP (en vert plein) et <i>V. aestuarianus</i> 02/041 (en bleu plein) établies à partir des dosages spectrophotométriques réalisés aux différents temps d'incubation.	170
Figure 37 : Cinétiques de croissance de <i>V. splendidus</i> LGP32-GFP (en vert) et <i>V. aestuarianus</i> 02/041 (en bleu) établies à partir des concentrations bactériennes estimées par dénombrement des colonies sur boîtes de culture.	171
Figure 38 : Gammes utilisées pour la quantification de <i>V. splendidus</i> LGP32-GFP (en vert plein) et <i>V. aestuarianus</i> 02/041 (en bleu plein) réalisées en triplicat.	172
Figure 39 : Cinétiques de croissance de <i>V. splendidus</i> LGP32-GFP (en vert) et <i>V. aestuarianus</i> 02/041 (en bleu) établies à partir des concentrations bactériennes estimées par PCR quantitative.	173
Figure 40 : Cinétiques des activités de type métalloprotéase mesurées dans les surnageants de <i>V. splendidus</i> LGP32-GFP (en vert plein) et <i>V. aestuarianus</i> 02/041 (en bleu plein).	174
Figure 41 : Facteurs d'expression des gènes <i>Vsm</i> et <i>Vam</i> obtenus dans les échantillons 1 à 3 pour les deux souches étudiées.	177
Figure 42 : Facteurs d'expression des gènes <i>Vsm</i> et <i>Vam</i> obtenus dans les échantillons 4 à 7 pour les deux souches étudiées.	178

Figure 43 : Cinétique des mortalités d'huîtres induites par l'injection de vibrions pathogènes (<i>V. splendidus</i> et <i>V. aestuarianus</i>) dans des conditions de température différentes (10°C, 16°C et 22°C).....	229
Figure 44 : Quantification de <i>V. aestuarianus</i> et OsHV-1 chez des individus témoins prélevés au cours de l'infection expérimentale N°1.....	242
Figure 45 : Taux de mortalité (%) observés le 15 mai 2008 pour chacune des 14 familles stockées dans la claire ostréicole.....	243
Figure 46 : Schéma des courbes de survies obtenues après injection de <i>V. splendidus</i> chez des huîtres ayant été soumises à un protocole de dépuración bactérienne (courbe bleu) et chez des huîtres non dépurées (courbe verte).....	253
Figure 47: Cytogrammes représentant l'évolution de l'hémolymphes lors d'un contact avec LGP32-GFP (en vert ou bleu fluo) en utilisant un rapport nombre de <i>Vibrio</i> sp./nombre d'hémocytes d'huître creuse égal à 100.....	256
Figure 48: Observations au microscope à lumière blanche ou à épifluorescence de champs identiques d'hémolymphes mise en contact (45 min) avec <i>V. splendidus</i> LGP32-GFP.	257
Figure 49 : Schéma représentant différentes interactions reliant une « population » d'huîtres et ses capacités de défense et des bactéries pathogènes du genre <i>Vibrio</i> , et leurs implications différentielles dans deux types d'environnements contrastés.....	297
Figure 50 : Schéma conceptuel d'études d'organismes au sein d'un écosystème.....	304

INDEX DES TABLES

Tableau 1 : Principales techniques d'amélioration génétique en aquaculture applicables dans un contexte d'amélioration de la résistance d'une population à un agent pathogène (Beardmore et McConnell, 1998).....	18
Tableau 2 : Principaux agents infectieux responsables d'épisodes de mortalité massive chez les huîtres.	27
Tableau 3 : Les trois postulats du modèle conceptuel de « Damage-response framework » élaboré par Casadevall et Pirofski (2003a).....	71
Tableau 4 : Les postulats moléculaires de Koch (Falkow, 1988; Casadevall et Pirofski, 2003a).....	73
Tableau 5 : Principales caractéristiques des souches utilisées.	163
Tableau 6 : Description des amorces et des sondes utilisées pour la quantification de <i>V. splendidus</i> LGP32-GFP et <i>V. aestuarianus</i> 02/041 en qPCR.....	166
Tableau 7 : Description des différents types d'échantillons d'ARNm étudiés issus de cultures pures de <i>V. splendidus</i> LGP32-GFP et de <i>V. aestuarianus</i> 02/041.....	168
Tableau 8 : Amorces utilisées pour la réaction de PCR ciblant spécifiquement les cDNA des métalloprotéases de <i>V. splendidus</i> LGP32 et <i>V. aestuarianus</i> 02/041.....	169
Tableau 9 : Mesure de l'activité de type métalloprotéase dans le surnageant au cours de cultures de LGP32-GFP et $\Delta\Delta Vsm509+2989$ en milieu classique Marine Broth et milieu conditionné.	175
Tableau 10 : Les 14 familles de pleins frères et demi-frères de la G5 choisies pour l'étude de l'effet de la composante génétique sur la sensibilité des huîtres à une vibriose expérimentale.....	233
Tableau 11 : Caractéristiques des infections expérimentales réalisées sur 14 familles de la G5.	234
Tableau 12 : Taux de survie obtenus deux jours après l'injection d'eau de mer artificielle stérile (témoin) ou de <i>V. splendidus</i> et <i>V. aestuarianus</i> pour chacune des 14 familles testées à trois reprises au cours du mois d'avril 2008 (Expérimentations N°1, N°2 et N°3).....	236
Tableau 13 : Les 14 familles de pleins frères et demi-frères de la G5 testées en infection expérimentale.....	237
Tableau 14 : Détection et quantification de <i>V. aestuarianus</i> et OsHV-1 par PCR quantitative dans des broyats totaux de tissus d'individus vivants prélevés dans la claire ostréicole à trois temps encadrant l'épisode de mortalité décrit ci-dessus.	244

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE	3
1 Aquaculture et maladies	3
1.1 Développement de l'aquaculture : production, enjeux et contraintes	5
1.2 Problèmes de pathologies en aquaculture	5
1.2.1 Maladies infectieuses en aquaculture	5
1.2.2 Définitions et notions	6
1.3 Étude et contrôle des maladies infectieuses en aquaculture	9
1.3.1 Identification et caractérisation des agents infectieux	10
1.3.2 Maîtrise et amélioration de la santé	11
1.4 Brève conclusion sur les aspects « aquaculture et maladies »	22
2 Ostréiculture et mortalités estivales	23
2.1 Ostréiculture et huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	23
2.1.1 Contexte mondial	23
2.1.2 Ostréiculture en France : histoire et production	24
2.1.3 Principales caractéristiques de l'élevage ostréicole	25
2.2 Pathologies et mortalités estivales	26
2.2.1 Mortalités estivales observées jusqu'en 2007 : une étiologie multifactorielle	28
2.2.2 Surmortalités d'huîtres creuses observées en 2008 et 2009	33
2.2.3 Épidémiologie	34
2.2.4 Des moyens de lutte limités	35
CONTEXTE SCIENTIFIQUE	37
1 L'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	37
1.1 Biologie élémentaire	37
1.1.1 Taxonomie et répartition	37
1.1.2 Écologie	37
1.1.3 Anatomie	38
1.2 Reproduction et cycle de vie	40
1.2.1 D'une description qualitative...	40
1.2.2 ... à une approche quantitative	42
1.3 Amélioration génétique	44
1.3.1 Gestion de la variabilité génétique	44
1.3.2 Sélection génétique	44
1.3.3 Triploidie	45
1.4 Système immunitaire et mécanismes de défense	48
1.4.1 La réponse cellulaire	49
1.4.2 La réponse humorale	56
1.4.3 Facteurs modulant les capacités de défense de l'huître	60
2 Les bactéries du genre <i>Vibrio</i>	63
2.1 Biologie des <i>Vibrio</i>	63
2.1.1 Caractéristiques générales	63
2.1.2 Taxonomie	64
2.1.3 Structure du génome	66
2.2 Vibrioses en aquaculture	67
2.2.1 Espèces de <i>Vibrio</i> pathogènes chez les poissons	67
2.2.2 Espèces de <i>Vibrio</i> pathogènes chez les crustacés	68
2.2.3 Espèces de <i>Vibrio</i> pathogènes chez les mollusques	69
2.3 Pathogénicité et Virulence	70
2.3.1 La notion de virulence chez les bactéries	70
2.3.2 Plasticité génomique	74
2.3.3 Les mécanismes de virulence des <i>Vibrio</i>	76
2.3.4 Régulation des mécanismes de virulence et quorum sensing	91
OBJECTIFS et APPROCHES DEVELOPPEES	94

INTRODUCTION GENERALE

1 Aquaculture et maladies

1.1 Développement de l'aquaculture : production, enjeux et contraintes

En 2006, la production mondiale de la pêche et de l'aquaculture cumulées avait atteint environ 144 millions de tonnes, dont 110 millions étaient destinées à la consommation humaine. Alors que depuis les années 90, la pêche se maintient au même niveau, l'aquaculture connaît un véritable essor dont le taux de croissance dépasse aujourd'hui celui de tous les autres secteurs de production alimentaire d'origine animale. De par son dynamisme et la croissance économique mondiale, ce secteur représente actuellement près d'un tiers de l'offre mondiale de produits halieutiques contre 4% en 1970 et fournit aujourd'hui près de la moitié du poisson consommé dans le monde. Ainsi, la production aquacole qui représentait un peu moins d'un million de tonnes par an au début des années 50 se situerait en 2006 à 51,7 millions de tonnes, pour une valeur de 78,8 milliards de dollars EU, soit une croissance annuelle de près de 7% (Figure 1) (FAO, 2009). La production marine, principalement orientée vers les poissons à fortes valeurs marchandes mais comprenant également un volume important de moules et d'huîtres, représente 34% des quantités produites, et 36% de la valeur économique totale.

L'augmentation spectaculaire de la production aquacole mondiale s'est accompagnée d'une modification notable des systèmes de production, visant des rendements de plus en plus performants et des surfaces dépassant de loin l'échelle d'un mode de production traditionnelle. Cette intensification ne s'est pas faite sans impact direct ou indirect sur les écosystèmes. La FAO a défini un certain nombre de ces effets, parmi lesquels apparaissent :

- une pression croissante sur les pêches pour l'obtention de farine et de d'huile de poisson,
- des modifications qualitatives et quantitatives des biocénoses de la zone exploitée et de son proche environnement,
- une eutrophisation des lacs et des zones côtières,
- une concurrence pour l'approvisionnement des ressources comme l'eau,

- une fuite des espèces élevées parfois non indigènes et potentiellement invasives et une interaction génétique et/ou pathologique entre l'animal d'élevage et l'animal sauvage,
- ou encore, un impact pour la santé humaine du fait de l'utilisation de produits chimiques pour le contrôle ou le traitement de maladies (FAO, 2009).

Le potentiel maximum des pêches de captures marines ayant été atteint et sous une pression démographique grandissante, l'aquaculture représente une alternative intéressante à la pêche, qu'il convient d'accompagner au travers d'une politique de gestion soucieuse d'un développement régulier et durable.

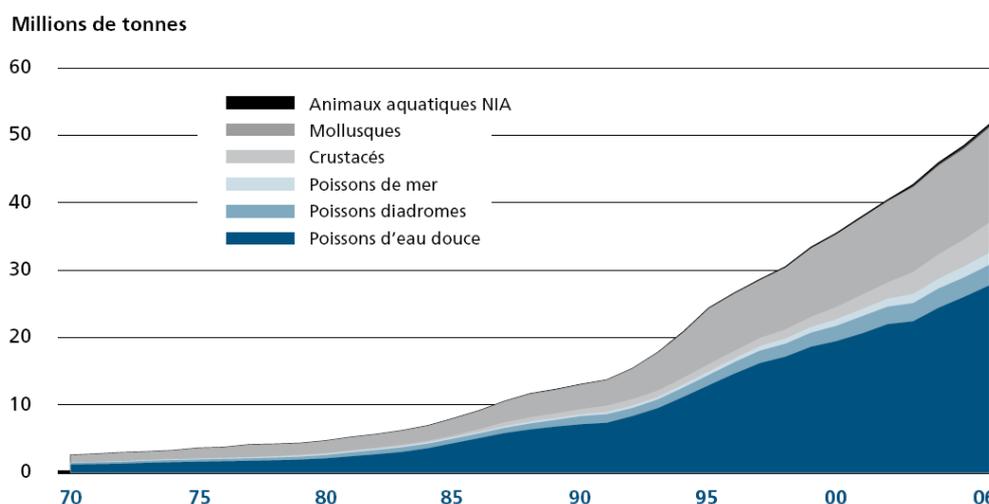


Figure 1 : Tendances dans la production aquacole mondiale de 1970 à 2006 : principaux groupes d'espèces. (FAO, 2009). NIA : Non Inclus Ailleurs

Si l'enjeu de l'aquaculture mondiale s'exprime en ces termes, il importe de considérer les composantes dans leur ensemble, tant au niveau des échelles microéconomiques et sociales qu'en matière de connaissances scientifiques. Le développement de l'aquaculture doit donc bénéficier d'un soutien permanent dans ce dernier domaine i. de façon à optimiser des systèmes de production respectueux des normes satisfaisantes en matière de pollution, d'environnement et de qualité des produits, mais également ii. de façon à favoriser une compréhension des espèces cultivées et des écosystèmes exploités. Cette base biologique de l'aquaculture est vaste et diversifiée. Elle intègre notamment des connaissances approfondies sur la biologie au sens large des espèces cultivées : reproduction en élevage, développement, croissance, nutrition, immuno-physiologie et écologie, génétique. L'ensemble de ces connaissances contribue à assurer des performances économiques et écologiques viables et durables des systèmes aquacoles : ceci passe évidemment par la surveillance et l'amélioration de la santé des animaux d'élevage ainsi que par la compréhension des phénomènes de mortalité qui constituent l'un des freins les plus importants de l'aquaculture (FAO, 2009).

1.2 Problèmes de pathologies en aquaculture

Le développement des maladies dans les élevages aquacoles reste une préoccupation majeure à laquelle aucune filière aquacole n'échappe aujourd'hui. Les pertes annuelles liées aux maladies en aquaculture sont estimées à 3 milliards de dollars US (Subasinghe, *et al.*, 2001). Si tous les épisodes de mortalité ne sont pas systématiquement l'expression d'une maladie, la plus large majorité relève de pathologies d'étiologies diverses. Le développement spectaculaire de l'aquaculture ces dernières décennies a été particulièrement propice à l'apparition de maladies : i. l'intensification des systèmes de production frisant dans certains cas le productivisme déraisonné et dépassant les niveaux de résistance des écosystèmes, ii. la mondialisation des échanges commerciaux internationaux et enfin, iii. l'impact anthropique sur l'environnement, la pollution et le réchauffement global, sont autant de facteurs contraignant les conditions d'élevage et favorisant l'apparition de mortalité ainsi que l'extension, la dissémination, l'émergence ou la réémergence d'organismes pathogènes à l'échelle globale (Harvell, *et al.*, 1999; Harvell, *et al.*, 2002; Murray et Peeler, 2005; Saulnier, *et al.*, 2007; Igbiosa et Okoh, 2008).

1.2.1 Maladies infectieuses en aquaculture

Parmi les causes identifiées, celles responsables des plus grosses pertes en aquaculture sont les maladies infectieuses ; elles sont à l'origine de conséquences économiques et sociales parfois dramatiques, pouvant aller jusqu'à la faillite de l'entreprise aquacole voire de l'ensemble de la filière. En plus de la chute des taux de survie dans les élevages conduisant à l'élimination d'une partie ou de la totalité des cheptels, les maladies infectieuses peuvent également influencer sur la croissance des animaux, sur leur aspect physique et donc leur commercialisation, aussi bien que sur les performances de production entraînant des rendements et des productions déficitaires. Qu'il s'agisse d'aquaculture de poissons (ex : Syndrome ulcératif épizootique, SUE ; Nécrose nerveuse virale, NNV ; Herpès virose de la carpe Koi, HVK), de mollusques (ex : Maladie à sphère multinuclée inconnue ou MSX pour Multinucleated Sphere Unknown ; Bonamiose) ou de crustacés (Maladie des points blancs, MPB ; Maladie à la tête jaune, MTJ ; Syndrome Taura, ST), tous ces systèmes ont connu récemment l'émergence de maladies infectieuses lourdes de conséquences. Même si l'évolution récente des techniques a ouvert considérablement le champ des possibles en matière d'analytique, les maladies infectieuses qui touchent les organismes d'intérêt aquacole n'ont évidemment pas été autant documentées que celles affectant l'homme. De plus, les spécificités propres à l'environnement

(accessibilité du milieu parfois réduite pour l'épidémiologiste) rendent difficile toute tentative de surveillance des élevages, comme détecter l'apparition des maladies et évaluer des descripteurs d'intérêt épidémiologique, la prévalence ou l'incidence d'un agent infectieux.

Pour toutes ces raisons, les maladies infectieuses touchant l'aquaculture doivent bénéficier d'une attention et d'un effort de recherche particuliers pour tenter d'en réduire l'impact économique et environnemental et pour assurer la pérennisation des productions devant répondre à des besoins croissants des sociétés.

1.2.2 Définitions et notions

Maladie

On définit généralement une maladie comme une altération organique ou fonctionnelle caractérisée par des causes, des symptômes, une évolution et des possibilités thérapeutiques propres.

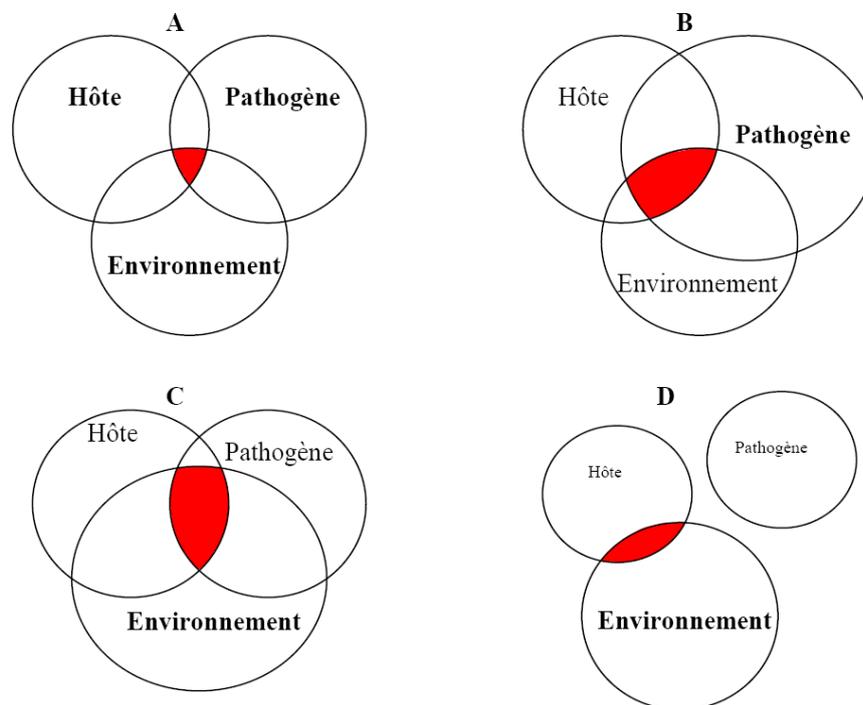


Figure 2 : Représentation de l'interaction complexe entre l'hôte, son environnement et l'agent pathogène, menant à l'expression (en rouge) d'une maladie multifactorielle (Snieszko, 1973; Lightner et Redman, 1998; Lemonnier, 2007).

- A) L'intensité de la maladie augmente proportionnellement à la circonférence de chaque cercle (augmentation du nombre d'agents pathogènes, de leur virulence, perturbation de l'environnement, stress des animaux en élevage, fragilité physiologique de l'hôte,...),
- B) L'intensité de la maladie est principalement liée à la présence d'un agent pathogène très virulent,
- C) L'intensité de la maladie est principalement liée à un environnement fortement dégradé,
- D) La maladie n'est pas liée à l'intervention d'un agent pathogène (éléments toxiques, produits chimiques...).

Les maladies touchant les organismes aquacoles présentent trois groupes étiologiques principaux : celles dont les causes sont des agents physiques (température, matière en suspension...), chimiques (teneur en gaz dissous, en matière azotée ou polluants divers...) ou enfin biologiques (algues, champignons, protozoaires, métazoaires, virus, bactéries), ces dernières comprenant les maladies infectieuses. Cette classification commune apparaît cependant peu pertinente au regard de la complexité et de la multiplicité des interactions pouvant lier plusieurs facteurs entre eux et conduire à l'expression d'une maladie. Une approche intégrée visant à représenter de façon conceptuelle les conditions d'apparition d'une maladie multifactorielle a été développée par Sniezsko en 1973 (Figure 2). Dépendante des propriétés de l'agent pathogène mais également de nombreux déterminants de l'hôte ou de facteurs de l'environnement, l'expression d'une maladie et son intensité reposent donc sur des interactions entre un ou plusieurs facteurs de ces trois compartiments. Les combinaisons et interactions sont aussi diversifiées que les organismes impliqués, et seule une approche intégrée de ce type peut aboutir à une compréhension des phénomènes de maladies et à l'identification de facteurs incriminés.

Maladies infectieuses

De la même façon, Lightner et Redman (1998) ont adapté cette approche multifactorielle aux pathologies infectieuses qu'ils ont alors définies comme étant « la conséquence d'une rupture d'équilibre entre un hôte, son environnement et un ou plusieurs pathogènes ».

Les maladies infectieuses sont provoquées par des micro-organismes de nature diverse (virus, bactérie, protozoaire, métazoaire, champignon), doués d'un pouvoir pathogène ou pathogénicité, c'est-à-dire une aptitude à provoquer des troubles, des effets pathogènes chez un hôte, et qui ont la faculté de se transmettre d'un individu infecté à un autre non encore infecté. Le pouvoir pathogène dépend i. du pouvoir infectieux (capacité à établir un foyer infectieux localisé dans un tissu chez un hôte d'une espèce donnée), ii. du pouvoir invasif (capacité à se multiplier et à se répandre dans les tissus voisins du foyer d'infection) et enfin iii. du pouvoir toxigène (la capacité à produire des toxines). La pathogénicité d'un micro-organisme est dépendante de nombreux facteurs exogènes et endogènes, de

l'hôte et de sa réaction de défense, ou de l'environnement. Le pouvoir pathogène d'un micro-organisme, qui reste une appréciation plutôt qualitative de la capacité à provoquer une infection, est évidemment dépendant de la virulence qui rend compte d'un point de vue quantitatif, de l'intensité de son pouvoir pathogène ou de sa capacité relative à causer une maladie.

Les maladies infectieuses sont donc définies comme étant la conséquence pathologique de la présence anormale et/ou de la multiplication d'un germe bactérien, viral, mycosique ou parasitaire, au niveau d'un tissu ou d'un organisme.

Infections bactériennes

Concernant les infections bactériennes proprement dites, les nombreuses études menées sur les maladies bactériennes affectant l'homme se basent communément sur une classification distinguant deux types de bactéries qualifiées de pathogènes (par opposition aux bactéries **commensales**) :

- les bactéries **pathogènes spécifiques**, 1. strictes ou obligatoires, elles provoquent un processus infectieux chez tous les individus infectés (ex : tuberculose, lèpre, vérole) et 2. non-strictes ou facultatives, elles possèdent la capacité à provoquer un processus infectieux alors qu'elles peuvent être présentes chez certains individus que l'on appelle porteurs sains ne déclarant pas la maladie associée (ex : bacille de la fièvre typhoïde) : ces deux types de bactéries pathogènes sont responsables d'infection répondant à une étiologie clairement caractérisée ;
- les bactéries **pathogènes opportunistes** provoquent des troubles lorsque les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies (ex : *Pseudomonas aeruginosa* provoque des infections des yeux, des plaies et des gastro-entérites aiguës) : l'étiologie de la maladie associée est alors extrêmement complexe répondant à un ensemble de paramètres et d'interactions variables d'un cas à l'autre. Il est intéressant de noter que la plupart des infections bactériennes humaines sont causées par des bactéries pathogènes opportunistes.

Cette distinction entre bactéries pathogènes spécifiques et opportunistes résulte directement des connaissances acquises au sujet des infections bactériennes chez l'homme et les mammifères : elle présuppose que le système immunitaire de l'hôte soit bien caractérisé, ce qui n'est pas le cas concernant les mollusques d'élevage, chez lesquels on ne sait pas encore définir précisément une immunodépression. De plus, le caractère généralement ubiquiste des bactéries rend bien difficile la définition de leur statut vis-à-vis de l'hôte. L'expression du caractère pathogène des bactéries opportunistes étant dépendante de nombreux facteurs notamment exogènes, il est difficile de considérer ces distinctions sans une appréciation plus dynamique des évolutions potentielles dans les écosystèmes. On sait aujourd'hui que l'émergence de maladies infectieuses, terrestres ou marines, apparaît le plus souvent à l'occasion d'une rupture écologique (Krause, 1998; Harvell, *et al.*, 1999;

Daszak, *et al.*, 2000; Harvell, *et al.*, 2002; Saulnier, *et al.*, 2007). Les causes de ces émergences (ou réémergence) font intervenir de façon intercurrente différents déterminants de l'écosystème dans son ensemble et dans son évolution, que ce soit l'agent pathogène (mutation, acquisition de nouveaux facteurs de virulence...), l'environnement *via* le dérèglement d'origine anthropique ou non d'un écosystème (changement d'un paramètre du milieu favorable à un agent infectieux, pollution...) ou l'hôte ou les espèces hôtes (immunodépression, réservoir, transfert...).

Pour conclure, depuis que Robert Koch, en 1882, a découvert la bactérie responsable de la tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, en plein boom de la théorie microbienne des maladies contagieuses pensée par Louis Pasteur, l'étude des maladies microbiennes et des interactions entre l'agent pathogène et son hôte a connu un véritable engouement. Elle profite aujourd'hui des progrès liés à la génomique et la génétique moléculaire, intégrant innovations techniques et outils de bioinformatique. Qu'elles soient accidentelles ou obligatoires, qu'elles résultent d'une intime association temporaire ou persistante, qu'elles impliquent de subtiles ou d'intenses réponses moléculaires ou cellulaires, ces interactions sont aussi diversifiées que les organismes impliqués. Pour l'hôte, l'issue de cette dynamique réciproque entre l'hôte et l'agent pathogène est la santé ou la maladie (Lupp, 2007).

1.3 Etude et contrôle des maladies infectieuses en aquaculture

Dans le but de développer des mesures de contrôle et de lutte visant à réduire l'impact économique engendré par les maladies infectieuses en aquaculture et sans compter l'intérêt « fondamental » des recherches dans ce domaine, trois approches peuvent être développées. Elles sont généralement basées de façon complémentaire i. sur une meilleure compréhension des phénomènes de mortalité et donc des trois compartiments, hôte, environnement et agents pathogènes et de leurs interactions et ii. sur l'amélioration de la santé des cheptels :

- la première approche vise l'identification de l'agent pathogène responsable et la caractérisation de sa virulence pour aboutir à des mesures prophylactiques et/ou thérapeutiques spécifiques, ainsi qu'au développement d'outils diagnostiques indispensables pour des études épidémiologiques ;
- la deuxième intègre la compréhension de l'environnement d'élevage au sens large, c'est-à-dire l'environnement biologique, physico-chimique et technique dans lequel l'hôte est élevé, afin i. d'identifier les facteurs environnementaux ayant une incidence sur la santé de l'hôte ou sur la

virulence et la transmissibilité de l'agent pathogène, ii. de caractériser les facteurs de risque susceptibles de favoriser ou conditionner l'apparition d'une maladie et iii. de proposer des mesures de gestion du risque zoonositaire adéquates ;

- enfin la troisième tend à approfondir les connaissances au sujet de l'hôte en identifiant les composantes physiologiques et génétiques conférant aux hôtes une plus grande sensibilité ou résistance aux agressions biotiques et/ou abiotiques dans l'objectif de sélectionner au sein de la population disponible les génotypes les mieux adaptés.

1.3.1 Identification et caractérisation des agents infectieux

L'identification du ou des agents pathogènes, ainsi que l'acquisition de connaissances sur son écologie et sa virulence, restent une étape qui apparaît primordiale à l'élaboration de mesures de gestion. La mise au point d'outils diagnostiques directs (recherche de l'agent responsable dans les tissus malades) ou indirects (recherche de la réponse immunitaire spécifique chez les espèces présentant un système immunitaire à mémoire cellulaire ou de marqueurs des troubles physiologiques induits par l'infection comme des anomalies de l'hématocrite ou de la bilirubinémie) et la caractérisation de symptômes, permettent le développement d'études épidémiologiques descriptives et analytiques indispensables à une meilleure compréhension des processus d'émergence et de dissémination d'agents pathogènes. Ces outils peuvent permettre *in fine* la mise en place de mesures zootechniques (quarantaine, assecs, décontamination d'infrastructures, ...), de contrôle avisé des transferts d'animaux et de leurs produits (gamètes, géniteurs...) empêchant ou du moins limitant la transmission d'un agent pathogène et préservant des zones indemnes.

De plus, l'identification et la caractérisation des agents pathogènes potentiellement impliqués est une étape indispensable à l'élaboration de protocoles de reproduction des maladies spécifiques en laboratoire, par infection expérimentale.

Même si l'identification des agents infectieux peut apparaître comme une étape essentielle dans la compréhension du déclenchement de pathologies infectieuses en aquaculture, elle peut être cependant dans certains cas difficile voire impossible du fait de l'insuffisance de l'état de connaissances sur l'étiologie de la maladie. Les recherches se tournent alors vers l'analyse des conditions d'apparition des mortalités et l'identification des facteurs de risque. De plus, la mise en évidence d'un caractère infectieux par des méthodes expérimentales indirectes peut suffire à élaborer des mesures de gestion, sans pour autant avoir isolé, identifié et caractérisé le ou les agents responsables. L'arrêt de mortalité après traitement antibiotique d'un lot présentant des mortalités

anormales peut être un exemple d'une démarche déductive d'intérêt vers une meilleure compréhension du phénomène.

Enfin, la caractérisation des mécanismes d'infection, de pathogénicité et des conditions d'expression des facteurs de virulence constitue évidemment un domaine de recherche i. fondamentale d'intérêt pour la compréhension des épisodes infectieux, et ii. appliquée pouvant ouvrir sur des mesures limitant les risques de développement de la maladie *via* une compréhension des processus environnementaux et de sensibilité de l'hôte en jouant sur la modulation d'un mécanisme de virulence comme, à titre d'exemple, une toxine dont l'expression et la production serait dépendante d'une condition de température.

1.3.2 Maîtrise et amélioration de la santé

1.3.2.1 Amélioration de l'environnement d'élevage

Pour tenter de gérer les pathologies aquacoles, un ensemble de stratégies peut être envisagé par l'amélioration de l'environnement d'élevage au sens large ce qui peut correspondre à une action indirecte sur l'hôte ou sur le pathogène. La vaccination, l'utilisation d'antibiotiques, de probiotiques, le recours à l'élevage sans pathogène, représentent autant de solutions envisageables. Evidemment la plupart de ces solutions ne sont adaptées qu'à certains modes de production. Globalement, il est admis que l'intensification des systèmes de production a tendance à augmenter la gravité et la fréquence des maladies infectieuses.

L'élevage sans pathogène : les populations « Specific Pathogen Free »

Pratiquer l'élevage dans un environnement sans pathogène constitue une solution qui semble maintenant possible moyennant 1. la décontamination des bassins avant ensemencement (ce qui implique des bassins recouverts de liners en polyéthylène par exemple), 2. une intensification des élevages pour limiter ou annuler les renouvellements d'eau (« Zero water exchange ») (Menasveta, 2002; Moss, 2004), 3. l'utilisation systématique d'animaux à statut sanitaire contrôlé « Specific Pathogen Free » (SPF) (Wyban et Swingle, 1999). Ceci représente une pratique de plus en plus courante à l'échelle mondiale, notamment en crevetticulture (Lotz, 1997). Cette pratique a permis en particulier à l'Asie de relancer sa production de crevettes en important des géniteurs de *Litopenaeus*

vannamei SPF alors que sa production s'effondrait à cause du White Spot Virus (WSV ou Maladie des points blancs, MPB).

L'utilisation d'antibiotique

Sans effet sur les virus, les antibiotiques constituent une solution facilement mise en œuvre lors d'épisodes de pathologies bactériennes dans certains types d'élevages. Si leur efficacité à court terme peut être bonne, leur utilisation régulière sur le long terme est génératrice d'antibiorésistances des bactéries ciblées (Brown, 1989; Nikaido, 2009) d'autant plus néfastes, qu'ils sont utilisés en milieu ouvert propice à la diffusion de souches pathogènes résistantes qui peuvent par la suite avoir un impact en terme de santé humaine (Angulo, 2000; Cabello, 2006). Par ailleurs, la réglementation sanitaire liée à l'utilisation d'antibiotiques est de plus en plus contraignante, ce qui se traduit par un arsenal thérapeutique très limité en ce qui concerne les antibiotiques ayant une autorisation de mise sur le marché pour une utilisation en aquaculture. Certaines filières aquacoles basent leur développement sur des labels de production garantissant la non-utilisation d'antibiotiques dans les élevages. C'est pour l'ensemble de ces raisons que de plus en plus de travaux se tournent vers la recherche de solutions alternatives pour contrôler les infections bactériennes en aquaculture (Defoirdt, *et al.*, 2007).

L'utilisation de bactériophage

Alors que les premiers bactériophages ont été découverts dans les années 1920, ce n'est que récemment qu'ils ont été envisagés comme traitement thérapeutique pour contrôler les maladies bactériennes en aquaculture (Nakai et Park, 2002). Cette lutte biologique vis-à-vis des infections bactériennes par le biais de l'utilisation de phages est d'autant plus avantageuse qu'elle permet d'éliminer spécifiquement la bactérie ciblée présentant un caractère pathogène pour l'animal et n'affecte donc pas les populations bactériennes environnantes (Nakai et Park, 2002). Cette méthodologie thérapeutique a d'ores et déjà fait l'objet de plusieurs études pour diverses applications, et notamment des applications alternatives à l'antibiothérapie (Clark et March, 2006; Fischetti, *et al.*, 2006). Quelques travaux rapportent des résultats encourageants suite à l'utilisation de phages dans le contrôle de vibrioses à *Vibrio harveyi* en aquaculture induisant une amélioration des survies larvaires en éclosion de *Penaeus monodon* (Shivu, *et al.*, 2006; Vinod, *et al.*, 2006; Karunasagar, *et al.*, 2007). Cependant, il est à noter que certains bactériophages peuvent porter des gènes de virulence potentiellement transférables aux bactéries, ce qui nécessite une caractérisation précise du

bactériophage avant son utilisation (Austin, *et al.*, 2003; Munro, *et al.*, 2003). De plus, il a été mis en évidence un développement rapide de résistance des bactéries au phage, impliquant l'utilisation d'un cocktail de phages (Fischetti, *et al.*, 2006).

L'utilisation de peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens sont des petites protéines (20 à 50 acides aminés), effecteurs de l'immunité innée que l'on retrouve à l'état naturel chez les vertébrés, les invertébrés, les microorganismes et les plantes. De nombreux peptides et protéines antimicrobiens ont été isolés chez divers organismes, et notamment chez *Crassostrea gigas* (Gueguen, *et al.*, 2005; Gonzalez, *et al.*, 2007b; Gueguen, *et al.*, 2009; Rosa, *et al.*, 2009; Schmitt, *et al.*, 2010) (cf. paragraphe 1.4.2.3). Testée *in vitro* contre des microorganismes, l'activité antimicrobienne de ces molécules isolées d'un grand nombre d'espèces présente un large spectre d'action (bactéries Gram négatif, Gram positif, champignons, virus) et provoque, par le biais de divers mécanismes, une désorganisation de la membrane des cellules cibles induisant leur mort. L'utilisation des peptides antimicrobiens en aquaculture pourrait représenter une bonne alternative aux antibiotiques (Dimarcq et Hoffmann, 2001).

L'utilisation d'inhibiteur de virulence : perturber le quorum sensing

Le quorum sensing est un mécanisme par lequel les bactéries coordonnent l'expression de certains gènes en présence ou en absence de molécules signal, appelées autoinducteurs (cf. paragraphe 2.3.4). Chez *V. harveyi*, les phénotypes contrôlés par ce système de quorum sensing sont la bioluminescence (Bassler, *et al.*, 1993) et la production de différents facteurs de virulence, comme un système de sécrétion de type III (Henke et Bassler, 2004a), une toxine extracellulaire (Manefield, *et al.*, 2000) et un sidérophore (Lilley et Bassler, 2000) (cf. paragraphe 2.3.3). L'utilisation de mutations ciblant des gènes de quorum sensing chez *V. harveyi* a permis de montrer l'implication du quorum sensing dans la régulation de la virulence de ce *Vibrio* chez des *Artemia* et des rotifères notamment (Defoirdt, *et al.*, 2005; Tinh, *et al.*, 2007). De plus, il a été montré que des molécules de type furanone interrompent les voies de signalisation du quorum sensing chez des bactéries Gram négatif (Ren, *et al.*, 2001; Manefield, *et al.*, 2002; Hentzer et Givskov, 2003) et induisent une augmentation de la survie de larves d'*Artemia* infectées avec différentes souches de *Vibrio* luminescents (Defoirdt, *et al.*, 2006) : ces résultats suggèrent que la perturbation des mécanismes de quorum sensing entraîne une atténuation de la virulence de ces *Vibrio* et ouvrent des perspectives intéressantes en matière de biocontrôle des vibrioses en aquaculture. De plus, ces inhibiteurs de

quorum sensing atténuent la virulence de certaines bactéries pathogènes sans en affecter la croissance : cette absence de pression de sélection laisse présager d'un faible risque de développement de résistance et leur vaut le qualificatif de molécules antipathogéniques, par opposition aux molécules antibactériennes. Cette caractéristique fait de l'utilisation des inhibiteurs de quorum sensing dans la gestion des maladies bactériennes en aquaculture, une stratégie de biocontrôle durable. De nombreuses études sont en cours et visent la synthèse de composés aux mécanismes d'action ciblant différents niveaux de signalisation et directement utilisables en aquaculture. Enfin, une approche alternative repose également sur l'utilisation directe de bactéries pouvant dégrader les molécules signal du quorum sensing (Leadbetter et Greenberg, 2000; Dong, *et al.*, 2002; Uroz, *et al.*, 2003) : l'utilisation de ce type de bactéries en tant que probiotique - bénéfique pour l'hôte - est en cours d'investigation.

La vaccination et l'immunostimulation

La stimulation des défenses de l'hôte, ciblant la réponse immunitaire spécifique par la vaccination ou améliorant les systèmes de défense non spécifiques par l'immunostimulation, constitue une stratégie visant une augmentation des capacités de résistance de l'hôte aux maladies infectieuses.

Seules quelques filières aquacoles, et plus particulièrement la pisciculture, peuvent bénéficier de la vaccination du fait des caractéristiques du système immunitaire à mémoire cellulaire des poissons (Gudding, *et al.*, 1999; Quentel, *et al.*, 2007). Malgré d'importantes recherches dans ce domaine (Crosbie et Nowak, 2004; Arijo, *et al.*, 2005; Lin, *et al.*, 2006), les quelques vaccins mis au point restent peu efficaces ou difficiles à administrer. Les modes d'administration (baignation ou injection réservée aux individus de grande taille) présentent des coûts et des efficacités très variables. Par ailleurs, ces traitements font l'objet d'une législation très contraignante. Cependant, l'induction d'une réponse immunitaire par la vaccination par ADN est une approche récente et prometteuse. Cette technique est basée sur l'introduction dans les tissus cellulaires (par voie intra-musculaire, par bombardement) d'un plasmide purifié d'ADN contenant une séquence codant pour un antigène donné. Cet antigène est alors exprimé par les cellules transfectées induisant une réponse immunitaire spécifique. L'efficacité de cette méthode a été montrée sur de nombreux modèles animaux (Adams et Thompson, 2006).

Par ailleurs, l'immunostimulation est une stratégie communément utilisée en aquaculture (Vadstein, 1997; Smith, *et al.*, 2003). L'immunostimulant est un terme générique regroupant un grand nombre de molécules, sucres, protéines, vitamines, hormones, isolées de bactéries, d'algues ou d'animaux et ayant des actions très diverses (Sakai, 1999). Plusieurs travaux rapportent des effets bénéfiques observés chez l'hôte, tels qu'une augmentation des activités pro- et phénoloxydase (cf.

paragraphe 1.4.2.1) ainsi qu'une amélioration des taux de survie à une vibriose expérimentale, suite à l'utilisation d'immunostimulants pour le contrôle de vibrioses chez différents crustacés (Alabi, *et al.*, 1999; Thanardkit, *et al.*, 2002; Marques, *et al.*, 2006). Cependant, l'utilisation d'immunostimulants reste contraignante : d'une part, leur utilisation non maîtrisée peut entraîner des dommages importants chez l'hôte (Vadstein, 1997; Smith, *et al.*, 2003), d'autre part, la réponse immunitaire à cette stimulation reste de courte durée et nécessite donc une administration répétée, qui entraîne une diminution des effets immunostimulants sur le long terme (Sakai, 1999).

L'utilisation de probiotiques

La première définition du terme « probiotique » faisait référence aux substances sécrétées par un microorganisme et stimulant la croissance d'un autre microorganisme (Lilley et Stillwell, 1965). C'est Parker qui, quelques années plus tard, a formulé le concept moderne de probiotique défini alors comme « organisme ou substance qui contribue à l'équilibre de la balance intestinale » (1974). Depuis, la définition de ce terme connaît de vifs débats et controverses. Finalement, on retiendra la définition complète et appliquée à l'aquaculture, proposée par Verschuere (2000b) : « un probiotique est un microorganisme vivant qui a des effets bénéfiques sur l'hôte en modifiant et améliorant les communautés microbiennes associées à l'hôte ou au milieu environnant, la fonction de nutrition, la valeur nutritionnelle de l'aliment, les capacités de réponse de l'hôte à une maladie ou encore la qualité du milieu ». Irianto et Austin (2002) en ont proposé une version condensée: « un probiotique est un microorganisme vivant ou un de ses composants qui a un effet bénéfique sur la santé de l'hôte ».

Aujourd'hui, de nombreux travaux rapportent les effets bénéfiques de microorganismes vivants appartenant généralement aux Lactic Acid Bacteria (LAB ou bactéries lactiques) et plus précisément au genre *Lactobacillus* sur la santé humaine (Fuller, 1989; Ouwehand, *et al.*, 2002). Concernant les applications aquacoles, les probiotiques constituent un mode de contrôle des pathologies aquacoles de plus en plus étudié. De nombreuses revues font état des développements réalisés pour l'utilisation de probiotiques dans les élevages aquacoles (Gatesoupe, 1999; Gomez-Gil, *et al.*, 2000; Verschuere, *et al.*, 2000b; Irianto et Austin, 2002; Balcázar, *et al.*, 2006b; Kesarcodi-Watson, *et al.*, 2008; Wang, *et al.*, 2008). La plupart des probiotiques proposés en aquaculture appartiennent aux LAB mais également au genre *Bacillus* (Moriarty, 1998; Nikoskelainen, *et al.*, 2001; Gatesoupe, 2002; Panigrahi, *et al.*, 2004; Picchiatti, *et al.*, 2008). Quelques études font état d'effets probiotiques de bactéries du genre *Vibrio* (Austin, *et al.*, 1995; Rodríguez, *et al.*, 2007).

Leurs modes d'actions sont multiples et plus ou moins directement dirigés vers la santé de l'animal (Verschuere, *et al.*, 2000b; Irianto et Austin, 2002; Birkbeck, 2004; Balcázar, *et al.*, 2006a; Kesarcodi-Watson, *et al.*, 2008). Ils peuvent être utilisés pour modifier directement le milieu d'élevage, l'eau et le sol (bioremédiation), soit en colonisant le milieu plus vite qu'un agent

pathogène, soit en intervenant dans le recyclage de la matière organique dans les bassins de production. D'autres agissent par exclusion compétitive avec les bactéries pathogènes dans l'hôte (émission de substance antibiotiques, compétition stérique, vis-à-vis des nutriments et de l'oxygène disponibles), par stimulation des réponses immunitaires humorale ou cellulaire ou encore par altération directe du métabolisme du pathogène et des mécanismes de quorum sensing. Enfin, certains probiotiques agissent par stimulation de la croissance et amélioration de la fonction de nutrition de l'hôte (source de macro- et micro-nutriments, modification de la microflore intestinale, contribution enzymatique à la digestion, détoxification de composés potentiellement toxiques).

La plupart des probiotiques utilisés ne se maintient pas dans le milieu et nécessite des adjonctions régulières augmentant le coût du traitement. De plus, les effets de la plupart des probiotiques sont testés *in vitro* et ne sont pas systématiquement transposables à des conditions *in vivo*. Par ailleurs, tout comme observées suite à l'utilisation d'antibiotiques, se développent également rapidement des résistances aux inhibiteurs de croissance (Verschuere, *et al.*, 2000b).

La nutrition et la gestion zootechnique

Mesurée en termes de volume, environ la moitié de la production aquacole mondiale n'est pas tributaire de l'apport d'aliments additionnels. Les animaux et les plantes ainsi cultivés se nourrissent d'aliments présents à l'état naturel dans l'eau. Les principales espèces cultivées ou exploitées rentrant dans cette catégorie sont les algues, les mollusques et certaines espèces de poissons.

Concernant la production d'espèces tributaires d'un apport d'aliments additionnels, l'adéquation de la ration alimentaire aux besoins des animaux peut le cas échéant avoir une action directe sur la santé des animaux. En particulier, la satisfaction des besoins en nutriments essentiels (vitamines, acides gras poly-insaturés, acides aminés essentiels,...) en période de stress environnemental est une voie de recherche pour stimuler les défenses immunitaires des espèces cultivées. Deux stratégies sont envisageables pour atteindre cet objectif : une meilleure formulation des granulés distribués, en particulier en période à risque, ou un meilleur contrôle par des pratiques zootechniques adaptées (aération, renouvellement d'eau) des efflorescences phyto- et zooplanctoniques qui se développent dans les bassins d'élevage et sont consommés par les individus, même si leur qualité nutritive peut être variable dans le temps.

Par ailleurs, diverses pratiques zootechniques sont communément appliquées à titre prophylactique dans la plupart des cas, pour prévenir des infections connues ou inconnues, ou alléger les structures d'élevage d'éventuels compétiteurs écologiques. On peut évoquer par exemple, les bains d'eau douce réalisés pour lutter contre des infections affectant des poissons marins (parasite de surface, bactériose cutanée, infections fongiques), l'immersion rapide de mollusques bivalves dans un

bain chaud (ex : huître perlière) ou l'exondaison (ex : huître creuse en Méditerranée) pour tuer les compétiteurs fixés. De plus, l'eau alimentant les structures de production terrestres est de plus en plus traitée par divers dispositifs (rayons UV, filtration chimique ou biologique). Enfin, la limitation des manipulations et des transferts des animaux, la gestion des densités d'élevage et l'entretien régulier des structures d'élevage sont autant de pratiques zootechniques appliquées pour maintenir des conditions d'élevage optimales.

D'une façon plus générale, l'amélioration des pratiques zootechniques peut permettre d'optimiser les conditions environnementales auxquelles sont soumis les élevages et diminuer les stress ou les pressions pathogéniques en élevage. Le contrôle de la température peut également limiter ou empêcher le développement de crises infectieuses, comme cela a été montré par exemple dans le cas de crises dues au White Spot Virus (WSV) (Vidal, *et al.*, 2001; Guan, *et al.*, 2003). Ces pratiques d'élevage visent donc l'amélioration de la santé de l'animal mais également *in fine*, celle du consommateur dans le cas où ces intérêts convergent.

1.3.2.2 Amélioration génétique de l'hôte

Les approches de génétique appliquées à la recherche et/ou l'amélioration d'une résistance à une maladie constituent des voies largement étudiées en aquaculture et bénéficient depuis quelques années des nouvelles techniques de génétique moléculaire (Tableau 1) (Beardmore et McConnell, 1998; Boudry, *et al.*, 1998; Hulata, 2001). De nombreuses études ont montré la contribution notable de facteurs génétiques dans les différences de sensibilité/résistance observées chez les poissons et mollusques d'élevage, rendant l'exploitation de la variabilité génétique pour la résistance aux pathogènes en aquaculture une perspective prometteuse (Quillet, *et al.*, 2007). La sélection génétique d'animaux présentant les phénotypes les plus adaptés pour répondre à diverses pressions et plus spécifiquement à la présence d'agents pathogènes reste la stratégie la plus couramment testée (Quillet, *et al.*, 2007). D'autres techniques, comme la gynogenèse ou la polyploïdisation, constituent des outils de choix pour l'analyse génétique et l'amélioration de caractères d'intérêt, comme la résistance à un agent pathogène, chez certaines espèces cultivées.

Tableau 1 : Principales techniques d'amélioration génétique en aquaculture applicables dans un contexte d'amélioration de la résistance d'une population à un agent pathogène (Beardmore et McConnell, 1998).

(D représente des applications existantes dans le cadre de la recherche de résistance à des maladies)

Techniques	Applications	D	Exemples	Limites
(1) Sélection génétique	Nombreux traits phénotypiques	√	Saumon de l'Atlantique (Norvège)	Réponse limitée si faible héritabilité mais possibilité de sélection assistée par marqueurs (QTL)
(2) Hybridation				
Intraspécifique	Nombreux traits phénotypiques	√	Carpe commune (Chine)	Exige des plans de croisements importants si des lignées consanguines sont utilisées
Interspécifique	Maintien de la qualité du stock de géniteurs		Esturgeon	Exige de considérer les facteurs environnementaux et l'intégrité du pool de gènes
(3a) Androgenèse	Production de lignées consanguines	√	Tilapia	Difficultés de mise en œuvre variable selon les espèces
(3b) Gynogenèse	Production de clones, monosexes	√	Nombreuses espèces	
(4) Supermâles (= YY)	Production de monosexes	-	Tilapia monosexes mâle	Possibilité de variabilité inter-souches du sex ratio
(5) Polyploïdie	Production d'animaux stériles	?	Truite arc-en-ciel	Pas toujours appropriée pour des applications de routine chez de nombreuses espèces
(6) Transgénèse	Nombreux traits phénotypiques	√	Saumon du Pacifique	Nécessite l'identification et le clonage des gènes et problèmes environnementaux et d'acceptation par les consommateurs
(7) Clonage nucléaire	Nombreux traits phénotypiques	√	Carpe commune	Techniquement difficile et problèmes d'acceptation par les consommateurs

La gestion de la variabilité génétique

De nombreuses études portant sur les espèces d'intérêt aquacole montrent la perte de variabilité génétique qu'ont subi les populations d'élevage reproduites à partir de stocks fermés par rapport à leurs populations sauvages d'origine (Sbordoni, *et al.*, 1986; Sunden et Davis, 1991). Cette perte de variabilité correspond à la fois à des pertes d'allèles (par dérive ou par sélection spontanée au cours de la domestication) et à une augmentation de la consanguinité dans ces populations domestiquées, ces deux facteurs menant à une diminution de l'hétérozygotie moyenne. Parallèlement, on a pu montrer chez les mollusques et chez les crustacés un effet positif du niveau d'hétérozygotie sur la croissance et la survie en élevage (Bierne, *et al.*, 2000; Naciri-Graven, *et al.*, 2000; Keys, *et al.*, 2004). La gestion de la variabilité génétique des stocks aquacoles constitue donc un impératif, en particulier dans le cas d'espèces introduites et domestiquées sans véritable considération génétique durant la phase pionnière de développement des élevages. La réintroduction de « sang neuf » constitue une option dont il convient d'étudier les modalités (en particulier réintroduction d'individus sauvages ou réintroduction d'individus domestiqués issus de populations différentes) et les conséquences potentielles en tenant compte des risques zoonosaires associés (Goyard, *et al.*, 2008).

La sélection génétique de populations résistantes à un agent pathogène

La sélection de lignées résistantes à des agents pathogènes est un des axes principaux de recherche, privilégié dans l'étude de nombreuses maladies chez les animaux, mais aussi chez les végétaux. La sélection génétique s'inscrit dans une approche de contrôle des maladies sur le long terme. De la façon la plus simple et la plus empirique, souvent au détriment de la variabilité génétique au sein de la population, cette sélection consiste à croiser entre eux des individus ayant survécu à une pression de sélection suffisante, c'est-à-dire, dans le domaine des pathologies, souvent létale pour une proportion relativement importante de la population. Ce mode de sélection peut conduire plus ou moins rapidement à la sélection d'individus ayant une résistance génétique relative ou totale à la pathologie étudiée. Ainsi, Embury et Hayford (1925), ont sélectionné comme géniteurs les truites survivantes à la furunculose et ont fait progresser la survie des truites à 6 mois de 2% à 60% en trois générations. Plus récemment, l'efficacité d'un programme de sélection génétique visant l'amélioration de la résistance des truites arc-en-ciel à la BCWD (Bacterial Cold Water Disease) a été démontrée en testant différentes lignées sélectionnées en infection expérimentale (Leeds, *et al.*, in press).

En crevetticulture, c'est également ce mode de sélection qui a probablement conduit à l'isolement de la souche *Penaeus stylirostris* « AQUACOP SPR 43 » résistante au virus IHNN (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis) (Weppe, *et al.*, 1992). Cependant ce résultat est, en l'occurrence, le fruit d'une domestication en présence de ce pathogène (autrement dit d'une sélection spontanée) et non pas le résultat d'un programme de génétique spécifiquement développé pour un caractère donné. Plus récemment, des programmes de sélection ont été menés, principalement sur *Litopenaeus vannamei*, afin de développer des souches résistantes au TSV (Taura Syndrome Virus) (Argue, *et al.*, 2002). Ces programmes trouvent leur application dans la production de souches sélectionnées dont le statut sanitaire SPF facilite techniquement la commercialisation à l'échelle mondiale (cf. paragraphe 1.3.2.1). Récemment, des résultats encourageants ont été rapportés pour la sélection d'une résistance à *Vibrio penaeicida* chez *Litopenaeus stylirostris* (Goyard, *et al.*, 2004).

Chez les mollusques, la sélection de lignées résistantes reste aussi une stratégie de choix pour la prévention des maladies infectieuses (Roch, 1999; Quillet, *et al.*, 2007) même si la plupart des exemples de sélection expérimentale concernent essentiellement la résistance aux parasites chez diverses espèces d'huîtres. Ainsi, un programme de sélection génétique visant à améliorer les performances de production de la Sydney Rock oyster *Saccostrea glomerata* produite en Australie a été mis en œuvre dans les années 90 (Nell, *et al.*, 2000) : depuis 2004, des lignées présentant une résistance améliorée aux deux parasites *Mikrocytos roughleyi* et *Martelia sydneyi* (QX disease) responsables de mortalités dans les élevages ont été transférées à la profession (Boudry, 2009). Des lignées de *Crassostrea virginica* présentant une résistance améliorée à la « MSX disease » causée par *Haplosporidium nelsoni* et à la « Dermo disease » causée par *Perkinsus marinus* ont été produites

(Haskin et Ford, 1979; Ford et Haskin, 1987; Calvo, *et al.*, 2003; Guo, *et al.*, 2003). De plus, chez cette même espèce, la résistance à la protéobactérie *Roseovarius crassostreae* (responsable de la « Juvenile Oyster Disease ») a été fortement améliorée par quatre générations de sélection (Farley, *et al.*, 1997, 1998). Chez l'huître plate européenne *Ostrea edulis*, deux programmes de sélection ont permis l'obtention de lignées présentant une résistance améliorée à *Bonamia ostreae* (Culloty, *et al.*, 2004; Lapègue, *et al.*, 2004). Enfin, même si des programmes de sélection génétique ont montré des effets bénéfiques potentiels sur le trait d'intérêt et le rendement, un faible pourcentage de la production ostréicole mondiale est basé sur des lignées génétiquement améliorées.

Une autre approche en termes de sélection consiste à sélectionner non pas pour un caractère de résistance à un pathogène donné, mais pour un phénotype potentiellement avantageux dans la réponse immunitaire de l'hôte ou encore un marqueur de résistance. Différents outils expérimentaux d'étude des bases moléculaires génétiques et fonctionnelles de la résistance aux maladies permettent aujourd'hui la caractérisation de marqueurs de sélection d'intérêt pour l'amélioration des réponses de l'hôte aux organismes pathogènes (Quillet, *et al.*, 2007). En particulier, l'existence de peptides antimicrobiens chez les invertébrés et notamment chez la crevette *Litopenaeus stylirostris* suggère que leur niveau d'expression pourrait représenter un bon indicateur de résistance aux agressions microbiennes (de Lorgeril, *et al.*, 2008). De plus, une approche QTL (Quantitative Traits Locus) ayant pour but de développer une cartographie permettant de détecter des relations entre les génotypes et le phénotype de meilleure résistance à la mortalité estivale chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* a permis d'établir une carte génétique à l'aide de l'ensemble des marqueurs disponibles (microsatellites et SNP, Single Nucleotide Polymorphism) (Sauvage, *et al.*, 2010). De même chez l'huître plate *Ostrea edulis*, des QTL corrélés à la résistance au parasite *Bonamia ostreae* ont été identifiés (Lallias, *et al.*, 2009). Enfin, chez *C. virginica*, des microsatellites et des marqueurs SNP issus d'une banque EST ont été caractérisés et servent de bases génétiques pour le développement de nouveaux outils de sélection (Quilang, *et al.*, 2007).

La polypléidisation

La polypléidisation consiste à ajouter un ou plusieurs jeux haploïdes de chromosomes à un génome diploïde. Le génome de base d'un organisme eucaryote est caractérisé par le nombre de chromosomes non homologues contenus dans le noyau d'une cellule (10 chez l'huître *C. gigas*). La plupart des individus du règne animal sont généralement diploïdes. Leur génome est constitué de la fusion des génomes haploïdes d'origine maternelle et paternelle lors de la fécondation. Les méthodes d'induction de la triploïdie consistent à augmenter la contribution de l'un ou l'autre des parents qui fournira alors deux jeux de chromosomes haploïdes à la descendance.

La triploïdie a été utilisée comme méthode d'amélioration génétique chez de nombreuses espèces de plantes cultivées, ainsi que chez les poissons (Beaumont et Fairbrother, 1991; Hulata, 2001) et les mollusques (Beaumont et Fairbrother, 1991). L'induction de la triploïdie se traduit généralement chez les animaux par une réduction de l'effort de reproduction, probablement due à un blocage de la méiose résultant de la difficulté d'appariement d'un génome non-balancé (Allen et Downing, 1986). Or, cette réduction de la gamétogenèse peut être théoriquement avantageuse pour plusieurs raisons : elle peut servir de méthode de confinement empêchant la dissémination des stocks cultivés, ou permettre la ré-allocation de l'énergie destinée chez les diploïdes à la reproduction vers la croissance et la résistance à un agent infectieux (Piferrer, *et al.*, 2009).

Pour conclure, le schéma ci-dessous (Figure 3) positionne dans le diagramme des interactions de Snieszko, les différentes actions envisageables en aquaculture pour la maîtrise des pathologies infectieuses et l'amélioration de la santé de l'hôte.

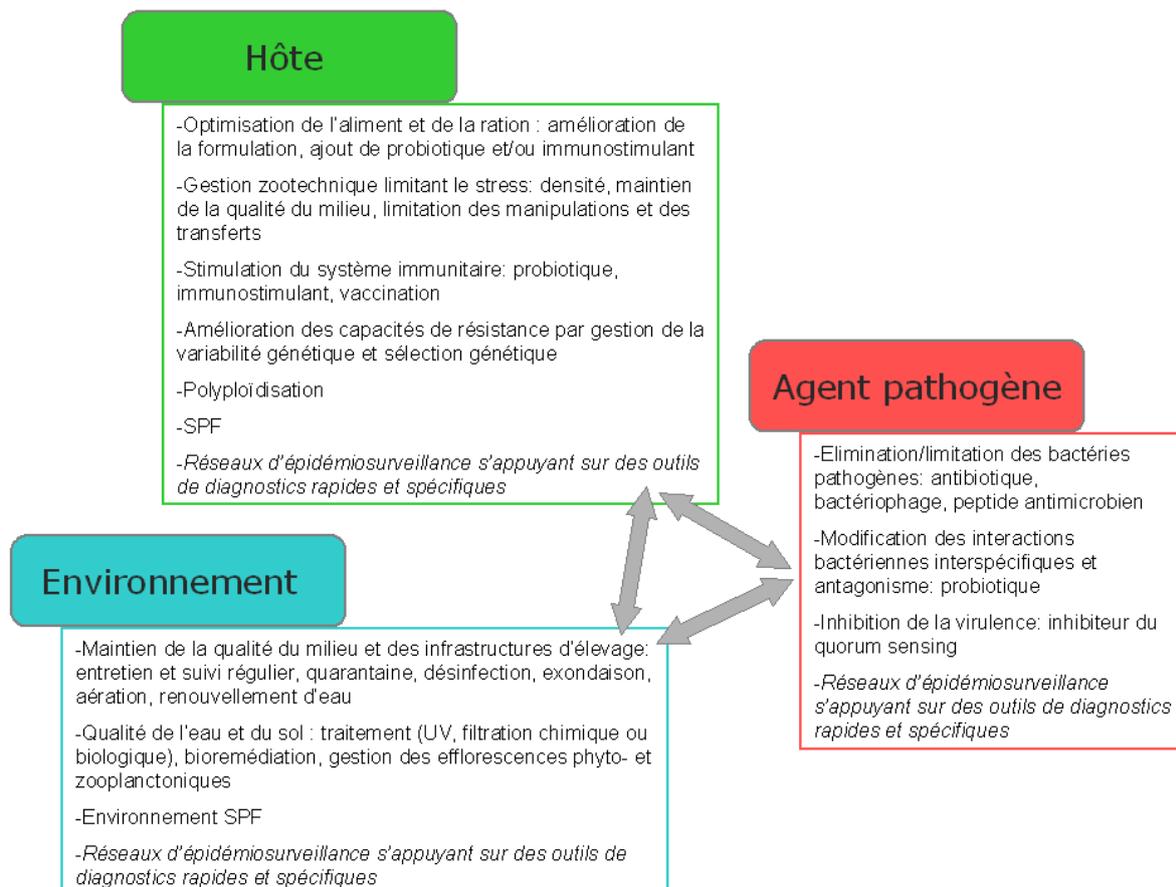


Figure 3 : Représentation schématique listant de façon non exhaustive différentes stratégies visant la prévention et le contrôle des maladies infectieuses en aquaculture.

1.4 Brève conclusion sur les aspects « aquaculture et maladies »

Pour conclure, le développement de l'aquaculture moderne passe par une meilleure maîtrise des pathologies et des interactions hôte-environnement-agents pathogènes dont elles sont le résultat : les approches intégratives visant la compréhension de ce système à trois compartiments apparaissent donc primordiales. Si une meilleure connaissance des agents pathogènes reste l'étape primordiale, les moyens de luttent nécessairement appel à une meilleure gestion de l'environnement d'élevage et des populations élevées. Qu'elles soient préventives ou curatives, ces mesures de lutte sont évidemment dépendantes des particularités biologiques des espèces impliquées, des pratiques d'élevage et des caractéristiques propres au système de production aquacole concerné. D'un élevage de type extensif à celui de type intensif, d'un système de production ouvert à un système de production fermé, de la pisciculture à l'ostréiculture, les moyens de lutte envisageables devront s'adapter aux contraintes et exigences propres à chaque filière et à chaque espèce ainsi qu'aux spécificités du milieu aquatique. Ces mesures doivent également respecter les réglementations sanitaires en vigueur, prendre en compte les contraintes économiques et sociales des régions touchées et se dérouler sur différentes échelles spatio-temporelles, de la situation d'urgence à l'échelle locale à la pérennisation des productions à l'échelle internationale.

2 Ostréiculture et mortalités estivales

2.1 Ostréiculture et huître creuse *Crassostrea gigas*

2.1.1 Contexte mondial

Même si la production mondiale aquacole reste dominée par les poissons d'eau douce, les mollusques représentent le deuxième groupe le plus produit dans le monde (en quantité) (FAO, 2009) (Figure 4), avec un volume s'élevant en 2006 à 14.1 millions de tonnes pour une valeur de 11.9 milliards de dollars EU. L'Asie domine de loin ce secteur de production, qui concerne principalement l'élevage de coquillages, en produisant plus de 80% du volume mondial. Neuf espèces appartenant principalement à quatre familles, Ostréidés, Vénéridés, Mytilidés et Pectinidés, assurent 85% de la production mondiale conchylicole : la production d'huîtres représente à elle seule un tiers de cette production mondiale. Du fait de sa croissance rapide et de sa tolérance aux variabilités des conditions environnementales l'huître creuse du Pacifique, *Crassostrea gigas* (Thunberg) originaire du Japon, a été introduite massivement dans divers centres ostréicoles mondiaux au cours du siècle dernier, notamment sur les côtes ouest du Canada et des Etats-Unis dans les années 20, puis en Océanie et en Australie (Tasmanie) dans les années 50. Actuellement l'espèce aquacole la plus cultivée à travers le monde, l'huître *C. gigas* place l'ostréiculture moderne dans une situation de quasi monoculture.

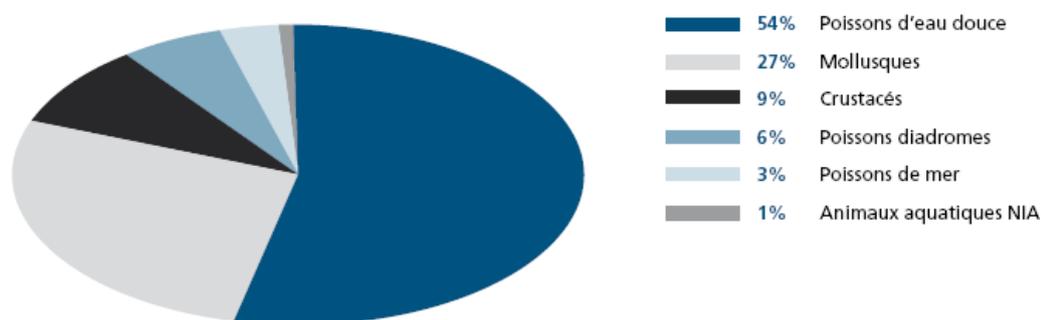


Figure 4 : Production aquacole mondiale (en quantité) : principaux groupes d'espèces en 2006 (FAO, 2009).

NIA : Non Inclus Ailleurs

2.1.2 Ostréiculture en France : histoire et production

De loin la première filière de production d'huîtres en Europe, l'ostréiculture en France représente plus de 70% du chiffre d'affaire réalisé par l'aquaculture française et repose essentiellement sur l'élevage de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dont le volume annuel avoisinait les 130 000 tonnes en 2006. La région Poitou-Charentes (21.5%), et principalement le bassin de Marennes-Oléron, la Normandie (21%), la Bretagne Nord (20.3%) et la Bretagne Sud (15.6%) se partagent aujourd'hui près de 80% de la production française d'huîtres creuses (Figure 5). Dans une moindre mesure, la France produit également une espèce endémique des côtes françaises, l'huître plate, *Ostrea edulis* dont la production ne s'élève aujourd'hui qu'à 1700 tonnes (données du Centre National de Conchyliculture).

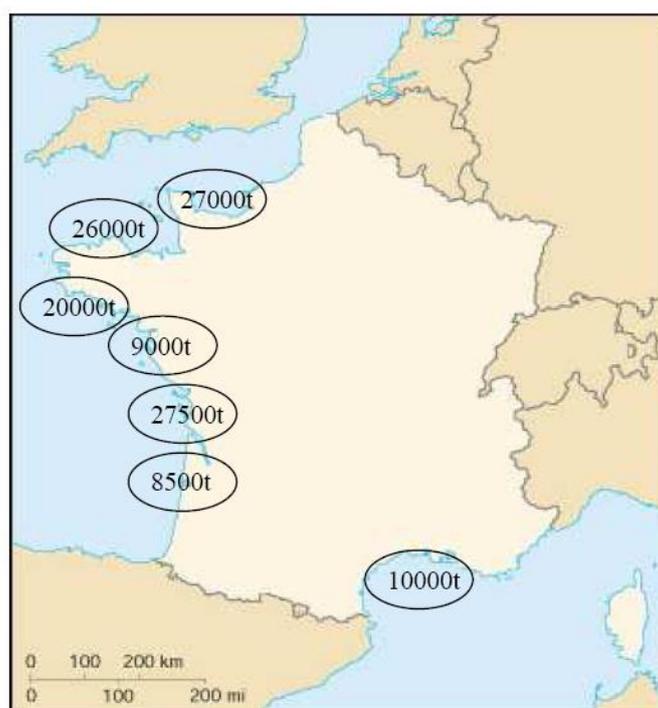


Figure 5 : Répartition de la production de l'huître creuse *Crassostrea gigas* sur les sites d'élevage français en 2006 (données du Centre National de Conchyliculture).

Ce dernier siècle, l'histoire de l'ostréiculture en France a connu une succession de phases de développement et de pleine exploitation alternant avec des périodes de crise, le plus souvent liées à la surexploitation du milieu naturel et/ou l'apparition de maladies (Figure 6).

Jusqu'au début des années 70, l'ostréiculture française reposait sur l'exploitation de l'huître *Crassostrea angulata*, ou huître portugaise, introduite accidentellement en 1868 dans l'estuaire de la Gironde. Alors que cette espèce colonisait rapidement les côtes françaises (Héral, 1985), sa production a brutalement été interrompue à la suite, selon toute vraisemblance, de l'émergence d'un *Iridovirus*,

responsable de la « maladie des branchies » entre 1969 et 1973, qui a conduit à la disparition totale de cette espèce sur nos côtes (Comps, *et al.*, 1976). Afin de relancer l'ostréiculture française, du naissain et des géniteurs de l'huître creuse *C. gigas* ont donc été importés massivement du Japon et de Colombie Britannique au début des années 70.

En parallèle, alors que la production d'huîtres plates pouvait atteindre jusqu'à 20 000 tonnes dans les années 50, deux épizooties causées par les parasites *Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae* (Grizel, 1974) ont entraîné la chute de la production de cette espèce de plus de 90% dans le milieu des années 70.

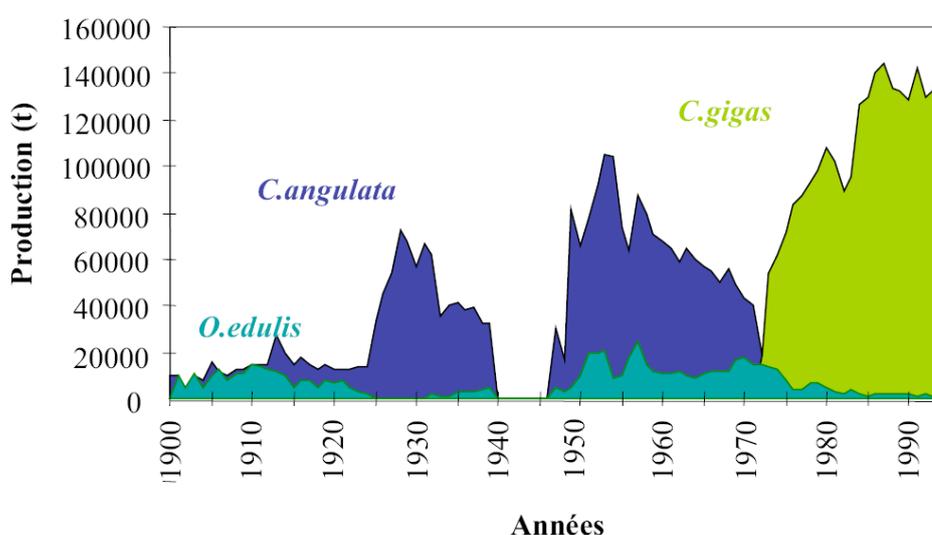


Figure 6 : Espèces d'huîtres produites en France au cours du XX^{ème} siècle (Gouletquer, *et al.*, 1998).

Le contexte militaro-socio-économique de 1940 à 1945 n'a laissé aucune donnée exploitable au sujet de la production ostréicole durant cette période.

L'apparition de maladies a fortement contraint les productions et influé sur l'histoire de l'ostréiculture : elle constitue encore aujourd'hui un frein au développement de l'élevage de l'huître creuse *Crassostrea gigas* d'autant plus inquiétant de par sa situation de quasi monoculture.

2.1.3 Principales caractéristiques de l'élevage ostréicole

Sous l'impulsion de son développement, l'ostréiculture a bénéficié d'un effort de recherche visant autant l'amélioration des techniques d'élevage que l'amélioration génétique de l'espèce cultivée, comme l'induction de la triploïdie (Hulata, 2001). Ainsi, la maîtrise du cycle de reproduction des huîtres creuses en milieu contrôlé conduisant au développement d'infrastructures d'élevage à terre

a profondément changé les pratiques culturelles et la structure économique et sociale de la filière ostréicole. Non seulement ces techniques modernes d'écloserie et de nurserie assurent aux ostréiculteurs une disponibilité en naissain palliant les mauvais recrutements naturels mais elles ont également permis la diffusion de naissain triploïde depuis la fin des années 90. Aujourd'hui, même s'il est encore difficile d'évaluer la part de la production issue d'écloserie qu'elle soit diploïde ou triploïde en France, il est évident que celle-ci est une composante croissante de la structure de la filière ostréicole française.

Contrairement à nombre d'autres filières d'aquaculture, le cycle d'élevage de l'huître creuse *Crassostrea gigas* se déroule majoritairement en milieu ouvert à proximité des côtes en conditions non contrôlées. La phase précoce du cycle d'élevage se déroule soit dans des infrastructures terrestres de production de naissain et pré-grossissement (écloserie, nurserie), soit dans le milieu naturel par le biais de techniques de captage naturel des larves d'huître. La phase de grossissement du cycle d'élevage, à proprement parler, se déroule quant à elle, uniquement dans le milieu naturel.

Les naissains issus du captage naturel, sont fixés sur des structures appelées collecteurs disposées au cours de l'été en bassins côtiers et destinées à servir de support de fixation pour les larves d'huîtres avant leur métamorphose. Six à dix-huit mois après la fixation, les huîtres sont détachées ("détroquées") de ces supports et transférées en poches grillagées posées sur des tables métalliques, disposées sur le sédiment pour l'élevage à plat, ou collées à des cordes pour l'élevage en suspension. Au cours d'un élevage, les lots sont à plusieurs reprises transférés vers des zones qualifiées de pousse ou d'affinage en claires avant commercialisation. L'impact de ces transferts de zones à zones (parfois très éloignées les unes des autres) sur la dissémination et la propagation d'agents potentiellement pathogènes est encore mal connu en France, même si l'on admet aujourd'hui que le contrôle de ces transferts représente un enjeu essentiel en épidémiologie pour la maîtrise des maladies infectieuses.

2.2 Pathologies et mortalités estivales

Dans le monde entier, la plupart des zones de production ostréicole ont subi des épisodes de mortalité, influençant survie et/ou croissance réduisant directement les rendements (Elston, 1993). Les agents infectieux causaux de quelques uns de ces épisodes de mortalité massive d'huîtres ont été clairement identifiés (Tableau 2) ; ce n'est pas le cas en ce qui concerne les mortalités estivales ayant affecté les élevages d'huîtres creuses jusqu'en 2007 et dont l'étiologie est multifactorielle (Samain et McCombie, 2008).

NB : Le tableau 2 ne se veut ni exhaustif ni catégorique mais simplement historique avec tout ce que cela implique d'imprécisions ou d'interprétations. Il synthétise les études réalisées sur l'analyse étiologique d'épisodes de mortalité faisant intervenir des agents infectieux qui ont fortement affecté l'économie des filières ostréicoles depuis la fin du XIX^{ème} siècle.

Tableau 2 : Principaux agents infectieux responsables d'épisodes de mortalité massive chez les huîtres.

	Agents responsables probables	Appellations	Date	Principales espèces d'huîtres affectées	Principales zones touchées
Champignon	<i>Ostracoblabe implexa</i>	maladie du pied et/ou maladie de la coquille	1877- et 1930-	<i>O. edulis</i> puis <i>C. angulata</i>	Europe
Parasite	<i>Perkinsus marinus</i>	Dermo disease	1950-	<i>C. virginica</i>	côte Est des Etats-Unis, Golfe du Mexique
	<i>Haplosporidium nelsoni</i>	MSX ou maladie de Delaware Bay	1950-60	<i>C. virginica</i>	côte Est des Etats-Unis
	<i>Haplosporidium costale</i>	SSO	1959-	<i>C. virginica</i> et <i>C. gigas</i>	côte Est des Etats-Unis
	<i>Haplosporidium sp.</i>		1972-	<i>S. glomerata</i>	Australie
	<i>Bonamia ostreae</i>	Microcell disease ou maladie hémocytaire de l'huître plate	1979-	<i>O. edulis</i>	Europe
	<i>Marteilia refingens</i>	maladie des Abers ou maladie de la glande digestive	1967-1973	<i>O. edulis</i>	Europe
	<i>Marteilia sydneyi</i>	OX disease		<i>S. glomerata</i>	Australie
	<i>Mikrocytos mackini</i>	maladie de l'île de Denman		<i>O. edulis</i> , <i>C. gigas</i> , <i>C. virginica</i>	Sud-Ouest du Canada
	<i>Labyrinthula sp.</i>	maladie de Malpeque	1915-1950	<i>C. virginica</i>	Canada, Amérique du Nord
Virus	<i>Iridovirus</i>	maladie des branchies	1967-1973	<i>C. angulata</i>	France
	<i>Iridovirus</i>	maladie hémocytaire	1970	<i>C. angulata</i> , <i>C. gigas</i>	France et Espagne
	<i>Iridovirus</i>	Oyster Velar Virus Disease	1980	<i>C. gigas</i> (larves)	écloseries Etat de Washington (EU)
	<i>Herpès Virus</i>		1991-	<i>C. gigas</i> (larves et naissains) et <i>O. edulis</i> (larves et naissains)	écloseries en France
Bactérie	<i>Vibrio sp.</i>		1970-	<i>C. gigas</i> (larves), <i>C. virginica</i> (larves), <i>O. edulis</i> (larves)	Europe et Amérique du Nord
	<i>Vibrio alginolyticus</i> et <i>Vibrio sp.</i>			<i>C. virginica</i> (naissains), <i>O. edulis</i> (naissains)	Europe et Amérique du Nord
	<i>Vibrio anguillarum</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>		1970-	<i>C. gigas</i>	Europe et Amérique du Nord
	<i>V. splendidus</i>		1991-	<i>C. gigas</i>	France
	<i>V. aestuarianus</i>		1991-	<i>C. gigas</i>	France
	<i>V. tubiashii</i>		1965 et ré-émergence en 2008	<i>C. gigas</i> (larves)	Etats-Unis
	<i>Rickettsia</i>		1990	<i>C. gigas</i>	France
	<i>Nocardia</i>			<i>C. gigas</i>	Etats-Unis, Japon
	<i>Roseovarius crassostreae</i>	JOD ou Juvenile oyster disease	1988	<i>C. virginica</i>	Nord-Est des Etats-Unis

2.2.1 Mortalités estivales observées jusqu'en 2007 : une étiologie multifactorielle

Qualifiées « d'estivales » puisque concomitantes avec la saison chaude, les mortalités estivales chez l'huître *Crassostrea gigas* sont observées et rapportées depuis les années 40-50 du Japon, où des taux de mortalité pouvaient atteindre 50 à 70% des populations (Imai, *et al.*, 1965; Koganezawa, 1974). A cette même époque, des phénomènes similaires ont été rapportés pour la première fois des Etats-Unis (Glude, 1975; Beattie, *et al.*, 1980; Perdue, *et al.*, 1981; Cheney, *et al.*, 2000).

En France, l'apparition de mortalité en période estivale a été observée dès l'introduction de *C. gigas* autour de 1970 (Maurer et Comps, 1986). En 1976-77 des mortalités significatives sont apparues dans les exploitations du Bassin de Marennes-Oléron, puis quelques années plus tard dans celles du Bassin d'Arcachon et enfin plus récemment, sur plusieurs sites de Bretagne et de Normandie. Touchant naissains et adultes, la variabilité spatio-temporelle de ces phénomènes de mortalité rend bien difficile leur étude. Les taux de mortalité varient de 30 à 100% en fonction du site, de l'année et du lot d'animaux concernés (Fleury, *et al.*, 2001; Soletchnik, *et al.*, 2005; Soletchnik, *et al.*, 2007). Différentes études ont permis d'identifier plusieurs facteurs susceptibles d'être impliqués dans ces phénomènes, comme des facteurs environnementaux, l'état physiologique des huîtres, un déterminisme génétique, des agents pathogènes opportunistes ou encore des pratiques culturales.

Devant la complexité de ces phénomènes et leurs impacts de plus en plus alarmants sur l'ensemble du littoral français depuis une quinzaine d'années, un programme multidisciplinaire MOREST (MORTalités ESTivales chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*) a donc été conduit par l'Ifremer de 2002 à 2005, qui visait la compréhension de ces épisodes de mortalité en vue d'améliorer la production. Ce programme abordait l'ensemble des thématiques susceptibles d'être en lien avec ce phénomène, comme la pathologie, la génétique ou en encore l'immuno-physiologie et l'étude de l'environnement ; il répertoriait également les épisodes de mortalité du littoral français de 1992 à 2005. A l'issue de ce programme (Samain et McCombie, 2008), trois caractéristiques principales des mortalités estivales ont été mises en évidence :

- **une association non systématique d'un ou de plusieurs types d'agents pathogènes** identifiés chez des huîtres moribondes : un virus apparenté à la famille des *Herpesviridae* (Ostreid Herpesvirus type 1 ou OsHV-1) (Renault, *et al.*, 1995) et des bactéries du genre *Vibrio*, appartenant principalement à deux espèces *Vibrio splendidus* et *Vibrio aestuarianus*. Certaines souches appartenant à ces deux espèces ont été particulièrement étudiées en

caractérisant leur variabilité génétique, leur pouvoir pathogène vis-à-vis de l'huître creuse *C. gigas* et leurs facteurs de virulence (Lacoste, *et al.*, 2001; Le Roux, *et al.*, 2002; Waechter, *et al.*, 2002; Gay, *et al.*, 2004a; Gay, *et al.*, 2004b; Le Roux, *et al.*, 2004; Labreuche, *et al.*, 2006a; Labreuche, *et al.*, 2006b);

- **une grande variabilité** dans l'intensité de ces mortalités en fonction des sites étudiés, des années considérées et de l'âge des animaux cultivés (Figure 7) ;

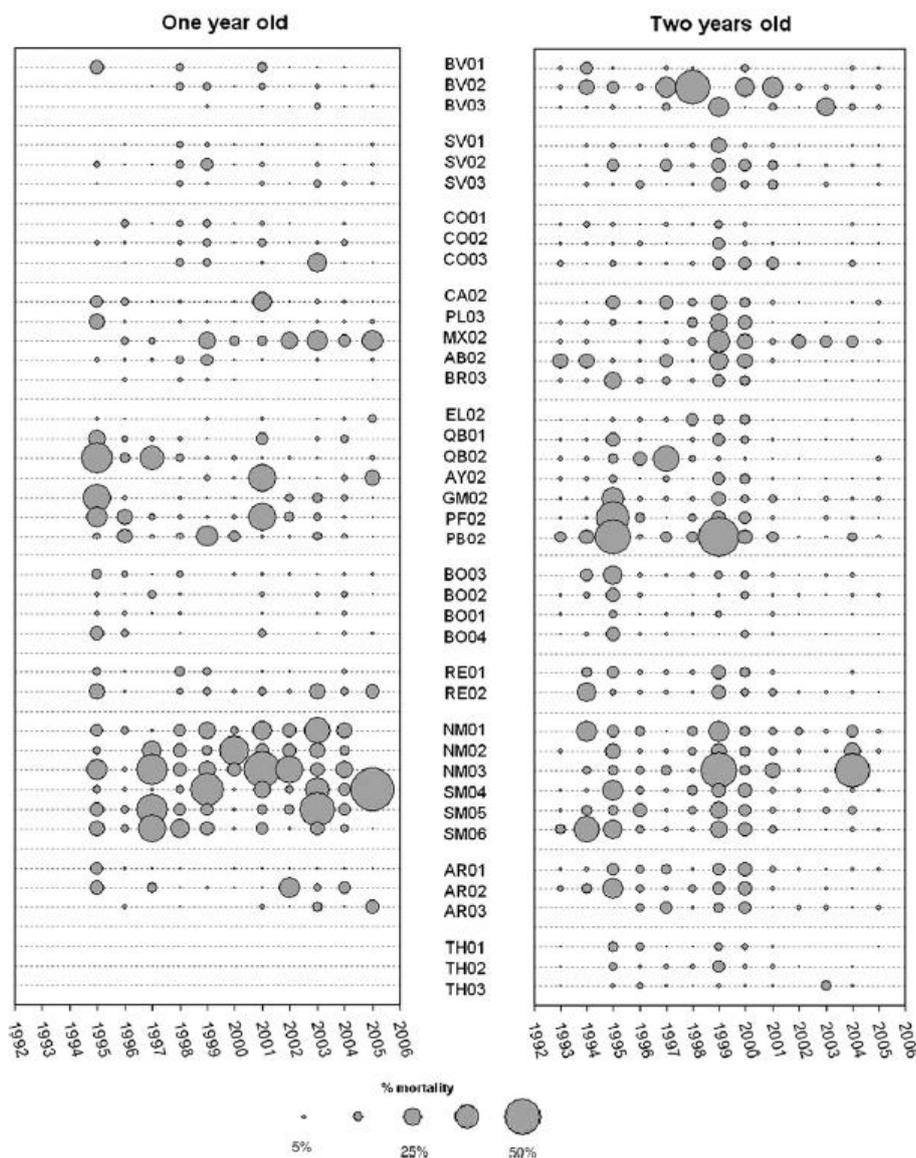


Figure 7 : Taux de mortalités des huîtres de 1 an et de 2 ans le long du littoral français entre 1995 et 2004 (1 an) et 1993 et 2004 (2 ans) (Soletchnik, *et al.*, 2007).

Régions : Baie des Veys (BV), Saint Vaast-La-Hougue (SV), Côte Ouest Cotentin (CO), Baie de Cancale (CA), Paimpol (PL), Morlaix (MX), Aber Benoit (AB), Rade de Brest (BR), Rivière d'Etel (EL), Baie de Quiberon (QB), Rivière d'Auray (AY), Golfe du Morbihan (GM), Baie de Peneff (PF), Pen-Bé (PB), Baie de Bourgneuf (BO), Ile de Ré (RE), Nord Marennes Oléron (NM), Sud Marennes Oléron (SM), Bassin d'Arcachon (AR), Etang de Thau (TH).

- **un caractère multifactoriel** de l'étiologie (Samain et McCombie, 2008) renvoyant directement à l'approche conceptuelle du diagramme de Sniezsko précédemment évoqué. L'apparition des mortalités estivales serait donc dépendante de la température du milieu (>19°C), de l'état de maturation gonadique avancée de l'huître, d'un déterminisme génétique et enfin de l'intervention d'un (ou plusieurs) agent(s) pathogène(s) (Figure 8).

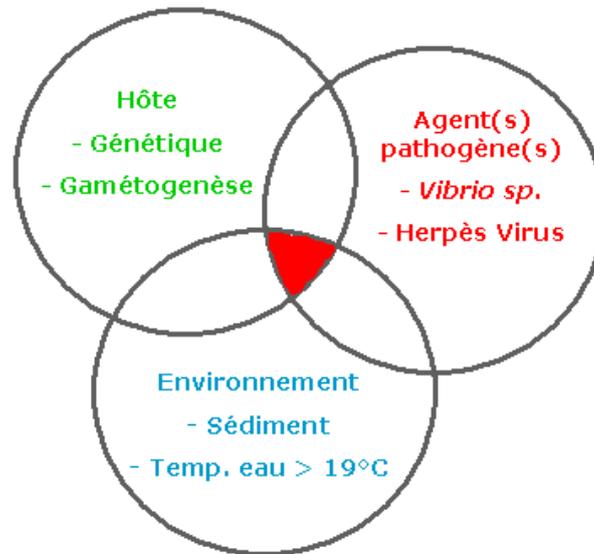


Figure 8 : Etiologie multifactorielle du phénomène de mortalités estivales d'huîtres creuses en France (Samain et McCombie, 2008).

Corrélés à l'apparition de certains phénomènes de mortalité, quelques facteurs de l'environnement ont été étudiés et peuvent être qualifiés de facteurs de risque environnementaux, tels la température, la pluviométrie ou la proximité des huîtres avec le sédiment. Le principal facteur relevé au cours de MOREST est la température du milieu : au delà de 19°C, on observait le déclenchement de mortalité. Cette hypothèse de l'existence d'une fenêtre de température de risque serait également à relier notamment :

- aux modifications physiologiques (reproduction et respiration) induites dans ces conditions et plaçant l'huître en situation de faiblesse physiologique, et
- à l'apparition de conditions plus favorables pour le développement de certains micro-organismes pathogènes (bactéries et virus).

La température apparaît donc déterminante puisqu'elle peut induire des déséquilibres environnementaux, des processus biologiques et microbiologiques défavorables et stressants pour l'hôte, conditionnant l'apparition ou l'intensité des phénomènes de mortalité. Il est intéressant de noter que des températures inférieures à 19°C ont été enregistrées au cours des épisodes de mortalité des années 2008 et 2009. De plus, la pluviométrie, associée aux apports d'eau douce et aux

substances véhiculées (nutriments et polluants), constitue un facteur aggravant pouvant induire une eutrophisation engendrant des situations d'hypoxie nocives pour l'huître, des efflorescences d'algues toxiques ou encore un déséquilibre dans les apports nutritionnels fragilisant la physiologie de l'huître (Cheney, *et al.*, 2000; Gagnaire, *et al.*, 2007). Enfin, l'effet du sédiment sur la variabilité de la mortalité a également été étudié (Soletchnik, *et al.*, 1999; Soletchnik, *et al.*, 2005; Gagnaire, *et al.*, 2006b) : sa proximité avec les élevages ou sa teneur en vase semblent influencer sur l'intensité des mortalités même si leurs effets se révèlent variables selon les environnements.

De façon générale, le milieu dans son ensemble, son évolution et ses modifications, peut influencer sur la sensibilité des huîtres à différents stress ou à un agent infectieux de la même façon qu'il peut agir sur les agents infectieux eux-mêmes, que ce soit sur leur répartition géographique à différentes échelles ou sur leur virulence.

De manière interdépendante, différents facteurs de l'huître sont susceptibles de moduler sa sensibilité aux phénomènes de mortalités estivales.

Tout d'abord, une approche de sélection divergente réalisée sur plusieurs générations a montré l'existence d'une composante génétique liée à la sensibilité du naissain. Des familles de type « R » pour résistantes et « S » pour sensibles ont été sélectionnées sur la base d'un critère de survie sur estran (dans un dispositif multi-sites) aux épisodes de mortalités estivales. Les mortalités moyennes obtenues sur la quatrième génération d'huîtres Résistantes et Sensibles montrent un différentiel de résistance aux mortalités estivales entre les huîtres R et S et une héritabilité significative de la survie à ces épisodes (Figure 9) (Dégremont, *et al.*, 2010).

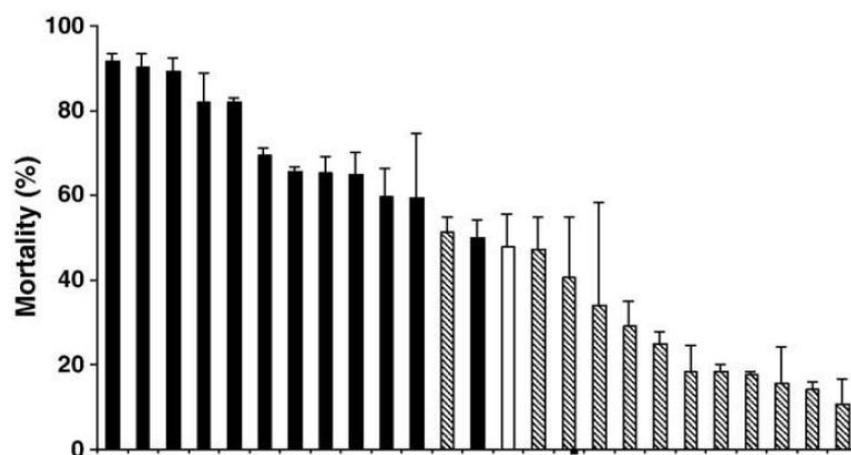


Figure 9 : Mortalités moyennes (\pm écartype) observées sur différents lots issus de la troisième génération des familles sélectionnées pour leur « faible » (histogrammes noirs) ou leur « forte » (histogrammes rayés) capacité de survie aux mortalités estivales (Dégremont, *et al.*, 2010).

Par ailleurs, l'influence de la reproduction sur l'état physiologique de l'huître et donc sur sa sensibilité aux mortalités estivales a également été étudiée. En effet, l'important investissement dans la reproduction observé chez *C. gigas* entraîne un coût énergétique vers la gamétogenèse qui se ferait au détriment des autres fonctions vitales. Cette forte demande énergétique associée au développement des tissus reproducteurs induirait une fragilisation physiologique de l'huître durant la période estivale réduisant ou perturbant ses capacités de défense contre de potentiels agents pathogènes (Samain, *et al.*, 2007; Boudry, *et al.*, 2008; Huvet, *et al.*, 2010).

Enfin, si aucun agent pathogène particulier ne semble être associé de manière systématique aux épisodes de mortalités estivales, des bactéries du genre *Vibrio* ainsi qu'un herpes virus-like (Ostreid Herpes Virus type 1 ou OsHV-1) ont été détectés de façon concomitante à leur déclenchement.

Plusieurs souches de *Vibrio* ont été isolées à partir d'huîtres issues de lots subissant des épisodes de mortalités estivales (Lacoste, *et al.*, 2001; Waechter, *et al.*, 2002; Gay, *et al.*, 2004a; Le Roux, *et al.*, 2004). Ce travail a abouti à l'établissement d'une collection de souches pathogènes pour *C. gigas*, constituée essentiellement de bactéries appartenant au groupe *V. splendidus* ou *V. aestuarianus* (Projet CRB, ministère de la Recherche – CNRS 2002-2004).

Une approche polyphasique, incluant des tests phénotypiques et une analyse phylogénétique, a permis de caractériser ces souches d'un point de vue taxonomique et d'en identifier certaines comme apparentées au groupe polyphylétique de *V. splendidus*. La souche LGP32, l'une des plus pathogènes pour l'huître *C. gigas* en infection expérimentale par injection, a été isolée lors d'expérimentations réalisées en aquarium de mise en contact d'huîtres d'apparence saine (collectées sur différents sites de la façade atlantique à proximité d'huîtres subissant des mortalités estivales) et d'huîtres n'ayant jamais subi d'épisodes de mortalité (Gay, *et al.*, 2004a). Un modèle d'infection expérimentale reproductible a été obtenu et une DL50 déterminée : la dose de 10^8 UFC (Unité Formant Colonie) injectées par individu provoque 50% de mortalité cinq jours post-injection (Gay, *et al.*, 2004a). De plus, il a été mis en évidence en infection expérimentale, des effets de synergie entre différentes souches de *V. splendidus*, dont la co-injection entraîne des taux de mortalité supérieurs à ceux obtenus par injection d'une souche unique (Gay, *et al.*, 2004a). Des travaux se sont orientés vers l'étude et la caractérisation des facteurs de virulence de souches de *V. splendidus*. Le séquençage complet de la souche *V. splendidus* LGP32 a alors été réalisé (Le Roux, *et al.*, 2009). L'annotation des gènes a conduit à l'identification *in silico* de gènes de virulence comme des métalloprotéases, des cytolysines, un système de sécrétion de type IV, et également de nombreux gènes codant des facteurs impliqués dans les voies de régulation du quorum sensing (Binesse, 2008; Le Roux, *et al.*, 2009). Le développement d'un système de génétique inverse pour la réalisation de mutants de *V. splendidus* a permis de démontrer qu'une métalloprotéase (Vsm, *Vibrio splendidus* metalloprotease) est le facteur

majeur de la létalité des produits extracellulaires de LGP32 lorsqu'ils sont injectés aux huîtres (Le Roux, *et al.*, 2007; Binesse, *et al.*, 2008) : cette métalloprotéase est le seul facteur de virulence de *V. splendidus* LGP32 décrit à ce jour. De plus, des travaux récents ont montré que la porine OmpU semble impliquée dans la résistance aux peptides antimicrobiens et dans la virulence de LGP32 chez l'huître *C. gigas* (Duperthuy, *et al.*, 2010). Enfin, par des approches de mutagenèse, différentes souches mutées présentant des gènes marqueurs, tel que celui codant la protéine fluorescente de la méduse *Aequorea victoria* (souche LGP32-GFP) ont été obtenues et constituent un matériel de choix, notamment pour la mise au point d'outils de détection et de quantification spécifiques nécessaires aux approches de reproduction expérimentale de vibriose et de suivi de pathogénèse.

Concernant la plupart des souches de *V. aestuarianus* étudiées, leur pathogénicité pour *C. gigas* a été confirmée en infection expérimentale par injection dans le muscle adducteur de 10^8 UFC par individu. La souche 02/041 présente une forte virulence vis-à-vis de l'huître creuse, puisqu'elle induit un taux de mortalité de l'ordre de 90% à sept jours post-injection (Labreuche, 2006). Le rôle clé d'une métalloprotéase à zinc dénommée Vam (*Vibrio aestuarianus* metalloprotease) dans la toxicité du sécrétome a été mis en évidence par une approche biochimique (Labreuche, *et al.*, 2006a). De plus, des études *ex vivo* portant sur l'étude des interactions entre une souche de *V. aestuarianus* et des hémocytes d'huîtres ont permis de caractériser l'action de *V. aestuarianus* qui semble échapper au système immunitaire en inhibant les capacités de phagocytose et d'adhésion des hémocytes (Labreuche, *et al.*, 2006a; Labreuche, *et al.*, 2006b).

Pour conclure, compte tenu de la variabilité des conditions et des facteurs de risque associées aux épisodes de mortalité, de l'absence d'une étiologie et de signes pathognomoniques et de la diversité des agents pathogènes associés à ces épisodes de mortalité, on peut se demander si les phénomènes de mortalité estivale sont la conséquence d'étiologies variables : explorer l'ensemble des scénarios pertinents apparaît donc comme une nécessité.

2.2.2 Surmortalités d'huîtres creuses observées en 2008 et 2009

En 2008 et 2009, des surmortalités conduisant très fréquemment et soudainement à des taux de mortalité chez l'huître creuse pouvant rapidement atteindre 100%, ont été observées sur l'ensemble du littoral français. Les conséquences économiques et sociales sont évidemment alarmantes et remettent en cause aujourd'hui la pérennité de cette activité ostréicole. Ces mortalités ont essentiellement affecté les huîtres *C. gigas* de classe d'âge inférieure à 18 mois dans l'ensemble des zones de production.

Au cours des épisodes de mortalité en 2008, des agents viraux (herpès virus OsHV-1) et bactériens (*Vibrio splendidus*, *V. aestuarianus*, bactéries du groupe *V. harveyi*) ont été détectés seuls

ou en association dans de nombreux échantillons prélevés (François, *et al.*, 2009a). Il est à noter la détection d'un nouveau génotype d'OsHV-1, appelé OsHV-1 μ var. De plus, une étude d'épidémiologie descriptive réalisée sur les épisodes de 2008 a mis en évidence un gradient d'apparition des mortalités orienté du Sud au Nord, débutant en Mer Méditerranée, puis sur la côte Atlantique, en Bretagne et enfin en Normandie (Miossec, *et al.*, 2009a). En 2009 comme en 2008, des agents viraux (OsHV-1 de génotype μ var uniquement sur les échantillons prélevés et analysés) et bactériens (bactéries du groupe *Vibrio splendidus* principalement) ont également été détectés seuls ou en association dans de nombreux échantillons prélevés (François, *et al.*, 2010). Il semblerait que l'année 2010 ne soit pas épargnée par ces mortalités d'intensité aussi exceptionnelle qu'en 2008 et 2009.

2.2.3 Epidémiosurveillance

Dans les réglementations européenne (directive 2006/88/CE) et française (arrêté ministériel du 4 novembre 2008, NOR : AGRG0825593A), l'expression « hausse de mortalité » est définie comme un « accroissement inexplicé et significatif de la mortalité au-delà du niveau considéré comme normal pour la ferme aquacole ou la zone d'élevage de mollusques concernés dans les conditions habituelles ; le niveau d'accroissement à désigner comme une hausse de la mortalité doit être convenu par l'exploitant et l'autorité compétente ». Les agents viraux et bactériens isolés dans les échantillons d'huîtres creuses prélevés lors des épisodes de mortalités 2008-2009 ne sont pas listés comme des agents à déclaration obligatoire au niveau mondial (Code sanitaire pour les animaux aquatiques 2009, OIE, organisation mondiale de la santé animale) et européen (Directive 2006/88/CE). Cependant, suite aux épisodes de mortalité exceptionnelle observés en 2008 et 2009, des mesures de lutte contre la surmortalité des huîtres de l'espèce *Crassostrea gigas* associée à la détection de l'herpès virus de l'huître 1 μ var (OsHV-1 μ var) ont été établies avec la mise en place de zones de confinement et de mesures de restriction de mouvements d'animaux (liste des zones de confinement consultables sur : <http://agriculture.gouv.fr/sections/thematiques/peche-aquaculture/aquaculture/conchyliculture>).

Le réseau Ifremer Repamo (REseau de PAtologie des MOllusques), créé officiellement en 1992, est un réseau de surveillance de l'état de santé des mollusques du littoral français métropolitain, qu'ils soient sur des gisements naturels ou en élevage. Il assure une mission réglementaire et une activité de service public déléguée par le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche à travers la Direction Générale de l'Alimentation (DGAl), autorité compétente en matière de santé des mollusques marins. Cette surveillance vise les espèces hôtes d'intérêt commercial (huîtres creuses, huîtres plates, moules, palourdes, coques, coquilles St-Jacques et ormeaux essentiellement) et leurs organismes

pathogènes présents en France et à ses frontières (virus, bactéries, champignons, protozoaires, métazoaires). Elle s'articule autour de trois protocoles d'épidémiosurveillance :

- protocole I : surveillance des infections à *Bonamia ostreae* et à *Marteilia refringens*,
- protocole II : étude des hausses de mortalité,
- protocole III : surveillance des populations élevées et sauvages de mollusques (étude de couples mollusques hôtes / agent infectieux).

Les échantillons collectés, les informations relatives au contexte de prélèvement et les résultats des analyses diagnostiques alimentent une base de données Ifremer, permettant l'édition des résultats de la surveillance pour l'autorité compétente (DGAI) et exploitable également pour des objectifs de recherche visant la compréhension des épisodes de mortalité (François, *et al.*, 2009b).

2.2.4 Des moyens de lutte limités

Comme nous l'avons évoqué plus haut, la gestion du risque zoonositaire est intimement dépendante des caractéristiques propres au mode d'élevage et à la biologie de l'espèce cultivée. Les particularités du mode de production de l'ostréiculture en milieu ouvert limitent les possibilités d'actions en matière de protection des huîtres vis-à-vis des maladies infectieuses. Tout traitement thérapeutique y apparaît inenvisageable ; seules les structures d'élevage contrôlé des stades de développement précoces des huîtres, comme les écloséries ou les nurseries, pourraient bénéficier de ce type de mesure, qui du reste n'est pas forcément optimale compte tenu notamment des risques d'apparition d'antibiorésistance. Un contrôle de la qualité zoonositaire des transferts d'huîtres et de leurs produits pourrait limiter la propagation du risque pathogène, si tant est qu'il existe des tests diagnostiques suffisamment sensibles et spécifiques de pathologies connues. Le recours à des tests non spécifiques témoignant de façon fiable de l'état de santé général du lot concerné (comme des tests d'évaluation des réactions à différents types de stress, thermique, manipulation, transfert...) peut constituer une méthode d'intérêt permettant de révéler une fragilité physiologique de l'animal ou un agent infectieux non détectable *a priori*.

Par ailleurs, les huîtres étant dépourvues d'immunité dite adaptative ou à mémoire cellulaire, l'application d'une vaccination est irréalisable tout comme le développement d'un diagnostic indirect. De par leur système circulatoire semi-ouvert, des huîtres apparemment saines peuvent également héberger dans la plupart de leurs tissus des agents potentiellement pathogènes qui ne soient pas détectables ou identifiables du fait i. de l'absence de méthodes de détection ou ii. de méthodes de détection dont la sensibilité ou la spécificité ne sont pas satisfaisantes. Enfin, aucun symptôme

prédictif d'une mortalité n'a aujourd'hui été caractérisé chez l'huître empêchant toute surveillance en amont de l'état de santé des populations.

Enfin, l'étude des bases génétiques de la sensibilité de *C. gigas* aux mortalités estivales indiquant qu'une amélioration de la survie des juvéniles est réalisable par la mise en place de programme de sélection (Dégremont, 2003; Dégremont, *et al.*, 2010), ce type de stratégie est aujourd'hui mise en oeuvre par les écloséries privées françaises avec l'appui du SYSAF (Syndicat des Sélectionneurs Avicoles Français). L'intégration d'huîtres sélectionnées au sein de la filière ostréicole française et leur éventuelle interaction avec les populations naturelles sont en cours de réflexion.

Les actions possibles pour lutter contre les maladies infectieuses chez les mollusques restent actuellement prophylactiques et s'accompagnent donc obligatoirement d'une meilleure connaissance des agents pathogènes potentiels et de leurs interactions avec l'hôte et ses caractéristiques biologiques dans son environnement.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

1 L'huître creuse *Crassostrea gigas*

1.1 Biologie élémentaire

1.1.1 Taxonomie et répartition

L'huître creuse *Crassostrea gigas* (décrite par Thunberg en 1793), communément appelée l'huître du Pacifique ou l'huître japonaise, est un mollusque bivalve de la famille des *Crassostreidae*.

Originnaire du Japon avec une aire de répartition originelle s'étendant vraisemblablement des rivages nord-est de la Russie au sud de la Chine, l'huître creuse a fait l'objet de nombreuses introductions à travers le monde, souvent liées à un contexte aquacole : en effet, sa réputation au sujet de sa croissance rapide et de sa tolérance aux conditions environnementales, a fait d'elle un coquillage de choix pouvant remplacer les stocks d'huîtres indigènes épuisés par la surexploitation ou les maladies (Hopkins, 2001). Aujourd'hui, on la retrouve sur les rivages de l'Europe et de l'Afrique du Nord, d'Afrique du Sud et de Namibie, d'Australie et de Nouvelle-Zélande et du Canada et des Etats-Unis, du Chili et d'Argentine.

1.1.2 Ecologie

Les huîtres du genre *Crassostrea* sont des résidentes naturelles des zones intertidales, des milieux estuariens et littoraux préférant les substrats solides sur lesquels elle peuvent se fixer, même s'il est possible de les trouver sur des fonds vaseux et sablo-vaseux et de les élever en pleine eau, jusqu'à 10 ou 20 mètres de profondeur. Les récifs denses formés par des bancs de *C. gigas* modifient considérablement l'écosystème par leur abondance et leur activité de filtration, offrant un nouveau type de substrat qui peut abriter lui-même d'autres espèces. L'huître creuse supporte une large gamme de températures (eurytherme), de salinité (euryhaline) et de milieux plus ou moins riches en nutriments (Coleman, 1986; Grizel, 1996). La grande variabilité des conditions biotiques et abiotiques du milieu intertidal, tant temporelle que spatiale, rend compte d'une forte plasticité phénotypique de l'huître, traduisant le contrôle des fonctions physiologiques par les paramètres environnementaux. Les

nombreux effets de l'huître creuse sur l'écosystème, limitant entre autres l'accessibilité de la nourriture et de l'espace pour d'autres espèces intertidales (Forrest, *et al.*, 2009), lui ont valu le qualificatif « d'ingénieur d'écosystème » (Crooks, 2002), et sa capacité de colonisation du milieu, une place dans la liste des espèces invasives (GISD, Global Invasive Species Database administrée par l'ISSG, Invasive Species Specialist Group) (NIMPIS, 2002).

1.1.3 Anatomie

L'anatomie de l'huître présente les caractéristiques des bivalves. Son corps mou est protégé par une coquille à deux valves asymétriques (V.), une valve inférieure (gauche) creuse et une valve supérieure (droite) plus plane, jointes par un ligament charnière et un muscle adducteur postérieur (Map.) (Figure 10). Le corps de l'animal est enveloppé dans le manteau (M.) dont les lobes sont soudés au niveau de la bouche et qui assure la croissance coquillière. Le manteau délimite la cavité palléale.

Les branchies (Br.), constituées de quatre feuillets lamellés et s'étendant le long du manteau sur la partie dorsale, assurent une double fonction de respiration et de nutrition en collectant les particules de nourriture. Les huîtres filtrent l'eau de mer et en extraient l'oxygène dissout et des éléments nutritifs.

La région antérieure du corps est constituée d'une capsule céphalique (Cc.), de quatre palpes labiaux (Pl.) au niveau desquels sont triées les particules acheminées et d'une bouche (B.). Les autres constituants de l'appareil digestif sont inclus dans la masse viscérale (Mv.) localisée en partie dorsale et composée d'un estomac muni d'un stylet cristallin qui assure le broyage et une première digestion, de glandes digestives au niveau desquelles se fait la digestion intracellulaire et enfin d'un intestin (I.) qui débouche vers l'extérieur de la cavité palléale et par lequel sont éliminés les déchets sous forme de fécès.

En période de reproduction, la gonade (G.) se forme autour de cette masse viscérale et se prolonge par un gonoducte (Gt.) qui aboutit contre la partie ventrale du muscle adducteur à l'intérieur de la cavité palléale.

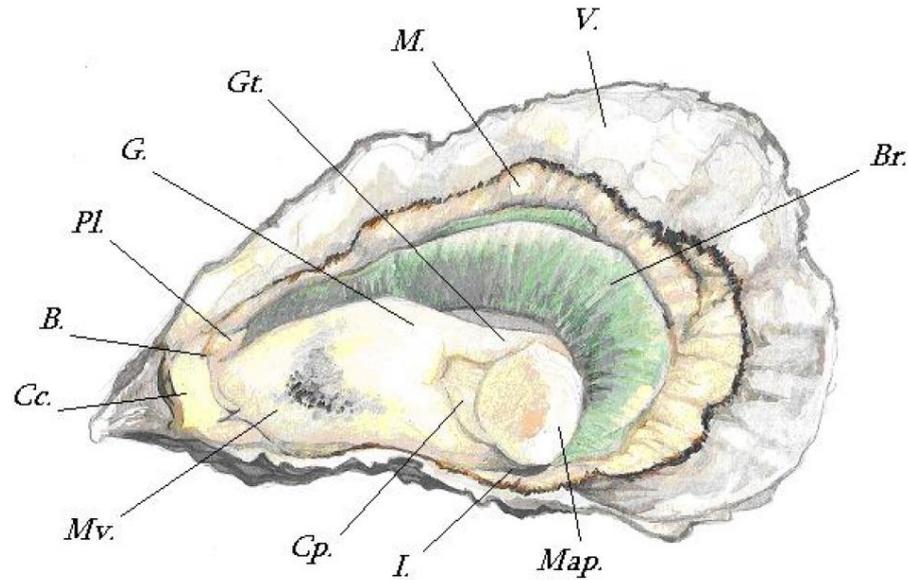


Figure 10 : Anatomie de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (illustration de J. Normand).

Dans la cavité péricardique (Cp.), entre la masse viscérale et le muscle, se situe le cœur, composé d'un ventricule et de deux oreillettes (Figure 11). Le ventricule expulse le fluide circulant, l'hémolymphe, vers les aortes antérieures et postérieures. L'hémolymphe circule ensuite dans les artères et artéριοles, puis dans des sinus de tailles variables qui connectent directement les organes à l'hémolymphe : ce système circulatoire partiellement clos est qualifié de « semi-ouvert ». L'hémolymphe est ensuite épurée dans le rein et circule vers les branchies par les vaisseaux afférents et en ressort chargé en oxygène après hématoxyse. Les vaisseaux efférents ramènent l'hémolymphe jusqu'aux oreillettes. Le système nerveux de l'huître est peu complexe et difficilement observable : il comprend principalement un grand ganglion situé sous le muscle adducteur et dont la fonction principale est d'assurer la fermeture des deux valves.

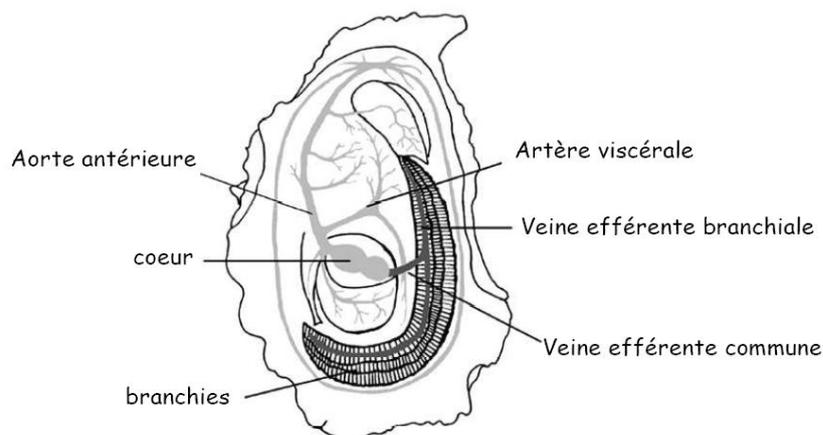


Figure 11 : Organisation du système circulatoire chez *Crassostrea gigas* (Bachère, *et al.*, 2004).

1.2 Reproduction et cycle de vie

1.2.1 D'une description qualitative...

L'huître creuse est un organisme hermaphrodite alterné protandre (la première maturation s'effectue généralement par le développement du tissu mâle) (Guo, *et al.*, 1998; Lango-Reynoso, 1999). L'orientation de son genre sexuel dépend soit de facteurs environnementaux, soit de facteurs génétiques (Guo, *et al.*, 1998), soit d'une action simultanée de ces deux déterminismes (Yusa, 2007) et reste mal connu.

La maturité sexuelle ou la capacité à produire une lignée germinale complète à partir des GSCs (Germinal Stem Cells issues des PGCs ou Primordial Germ Cells) atteignant le stade gamétique semble intervenir très tôt, dès la métamorphose. Le développement gonadique est un phénomène continu et annuel dont la dynamique est influencée par des facteurs environnementaux. Le développement gonadique peut être décrit en 4 phases successives qui peuvent parfois être chevauchantes notamment chez les individus triploïdes (Fabioux, 2004; Normand, 2009), 1. une phase de prolifération mitotique goniale (hiver), 2. une phase de gamétogenèse (printemps), 3. une phase de maturation gonadique (printemps-été) et enfin 4. une phase de fraie ou « ponte » (été) et de résorption gonadique des produits germinaux non-émis (automne).

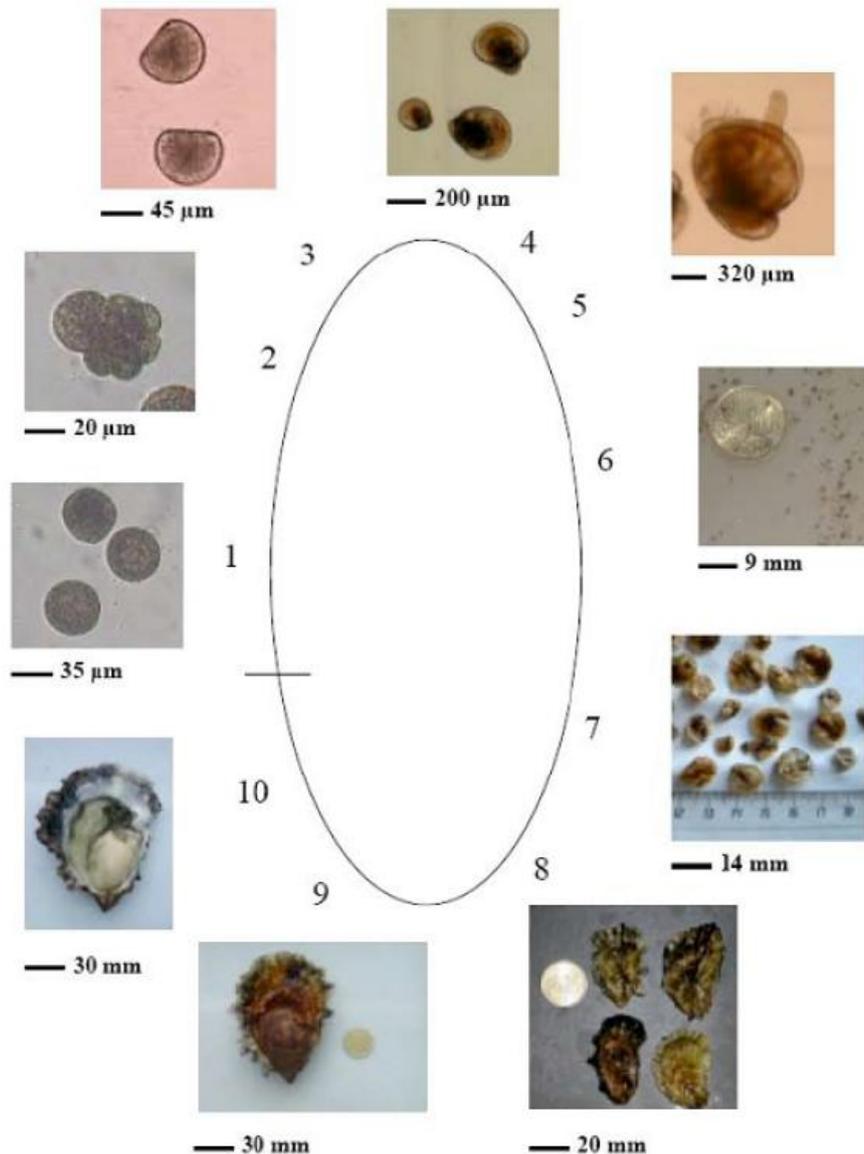


Figure 12 : Cycle biologique de l'huître creuse (Normand, 2009).

1-fécondation : ovocytes en présence de spermatozoïdes (points noirs) ; 2-embryon au stade morula (2-3 heures) ; 3-larves D (24 heures) ; 4-larves véligères (14 jours) ; 5-larve pédivéligères (18 jours) ; 6-naissains post-fixation (1 mois) ; 7-naissains (2 mois) ; 8-naissains (6 mois) ; 9-adulte (10 mois) ; 10-géniteur mature (10 mois).

Le cycle de vie de l'huître creuse se déroule en deux phases : une phase larvaire libre ou planctonique suivie d'une phase benthique ou fixée sur un support (Figure 12). La fécondation est externe et a lieu dans la colonne d'eau après l'émission estivale des gamètes. Après fécondation, le développement de l'œuf (1) passe par les stades précoces d'embryogenèse, morula (2), blastula, gastrula et donne naissance à une larve trocophore pélagique. Rapidement (24h après la fécondation), cette larve se transforme en larve véligère avec le développement de la première coquille embryonnaire dont la forme lui confère le qualificatif de larve D et l'apparition du velum qui assure locomotion et captation du phytoplancton (3). Au bout d'une vingtaine de jour (4), la larve change son

comportement planctonique : elle développe son pied, devenant larve pédivéligère (5) et gagne le substrat et s'y fixe avant d'entamer sa métamorphose (6). La jeune huître (7-8) acquiert dès lors toutes les caractéristiques de l'adulte (9-10).

1.2.2 ... à une approche quantitative

Chez l'huître creuse, deux types de mesures individuelles sont traditionnellement réalisés pour la description de la reproduction au sens large du terme. La première s'attache à la détermination histologique du stade de gamétogenèse observé chez un individu selon une échelle descriptive (Mann, 1979; Lango-Reynoso, *et al.*, 2000) et constitue un indicateur qualitatif de la maturité sexuelle. Ce dernier rend compte chez un individu, de l'état d'avancement des processus de synthèse de tissu reproducteur à un temps t .

Le deuxième type de mesure vise à estimer le développement gonadique par divers indicateurs quantitatifs de l'allocation à la reproduction. Plusieurs méthodes sont disponibles pour de tels objectifs : du comptage gamétique par cytométrie en flux (Ernande, 2001), des techniques ELISA (Royer, *et al.*, 2008) ou d'imagerie par résonance magnétique (Davenel, *et al.*, 2006), ou enfin de l'histologie classique. Par ces approches d'histologie, la quantité de tissu gonadique synthétisé à un temps t est estimée individuellement : cet estimateur quantitatif de la reproduction communément appelé l'occupation gonadique, est le rapport de la surface de la gonade par la surface de la masse viscérale, mesuré par analyse d'images de lames histologiques (Normand, *et al.*, 2009). En pratique chez les mollusques, cet estimateur quantitatif est considéré comme rendant compte de l'investissement énergétique en croissance somatique et gonadique, appelé allocation à la reproduction et permet donc la comparaison de l'effort reproducteur de différents lots d'huîtres à un instant t .

La variabilité du processus de reproduction observée à différentes échelles spatio-temporelles et biologiques (individu, lot, famille, stock, population), tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif, a fait l'objet de nombreuses études visant à déterminer les principaux facteurs affectant cette allocation à la reproduction chez *C. gigas*. Deux types de facteurs ont été décrits comme déterminant cette variabilité dans l'intensité de la reproduction :

- un déterminisme génétique : des lignées produites dans le cadre d'une sélection divergente de pool de familles présentant une réponse contrastée suite à des phénomènes de mortalités estivales ont montré en première génération une dynamique d'émission gamétique également contrastée et un différentiel d'occupation gonadique à l'apex de maturité (Ernande, *et al.*, 2004; Boudry, *et al.*, 2008; Huvet, *et al.*, 2010). Les travaux de Normand (2009) semblent confirmer l'existence d'un déterminisme génétique de l'intensité de l'effort de reproduction ;

- les déterminismes environnementaux : il est clairement admis aujourd'hui que i. la quantité et la qualité de la nourriture ingérée et ii. la température sont les deux principaux facteurs environnementaux influençant la croissance gonadique et la dynamique de processus métaboliques associés, que ce soit l'initiation de la gonadogenèse, la dynamique de celle-ci ou encore le déclenchement des émissions gamétiques (Deslous-Paoli JM., *et al.*, 1982; Chavez-Villalba, *et al.*, 2003; Fabioux, *et al.*, 2005).

Le développement récent des modèles de croissance dynamique (DEB : Dynamic Energy and Mass Budget) (Kooijman, 2000) inspirés des théories de bioénergétiques de la physiologie a grandement contribué à la compréhension des variabilités phénotypiques des huîtres dans leur environnement et aux relations existantes entre les trois grandes fonctions physiologiques, la croissance, la reproduction et la survie. Ainsi, si on fait le postulat selon lequel « un organisme bénéficie d'une quantité d'énergie limitée, acquise par la nutrition et allouée aux trois fonctions physiologiques », il en découle que l'investissement énergétique dans une fonction physiologique se traduit donc par un coût payé par les autres fonctions (Stearns, 1976). Selon cette approche, l'effort de reproduction ou effort reproducteur (ER) peut être défini comme la portion du budget énergétique global dédiée aux processus liés à l'accroissement du succès reproducteur à un instant t (Todd et Havenhand, 1983). Chez l'huître creuse, cet effort reproducteur intègre principalement la quantité d'énergie consacrée à la production de gamètes, qu'on appelle l'allocation à la reproduction. L'intérêt biologique de cette approche repose sur les connections entre les trois fonctions : la variation de l'allocation énergétique pour l'un de ces trois traits entraîne la variation de l'allocation énergétique pour l'un et/ou l'autre des deux autres traits (Ernande, *et al.*, 2004).

Chez *C. gigas*, il a été mis en évidence une corrélation phénotypique négative entre reproduction et survie aux phénomènes de mortalités estivales (Samain, *et al.*, 2007), illustrée par la fragilisation physiologique des individus du fait de l'important investissement énergétique développé dans la reproduction en période estivale qui pourrait contribuer à l'apparition de ces mortalités. Enfin, la différence d'investissement à la reproduction observée chez les huîtres triploïdes (Normand, *et al.*, 2009), suggérant une réallocation potentielle vers la fonction de survie, est apparue comme un atout majeur pour l'ostréiculture, qui reste à documenter précisément (cf. paragraphe 1.3.3).

1.3 Amélioration génétique

Le rendement de production de *C. gigas*, est variable dans le temps et dans l'espace. Ceci peut être expliqué par le fait que, contrairement à la plupart des espèces d'intérêt agricole, l'huître creuse cultivée est une espèce génétiquement « sauvage » qui est cultivée dans un milieu aquatique naturel non contrôlable par nature. Les stocks cultivés sont soumis à la sélection naturelle, contrairement aux souches domestiquées, la domestication étant définie comme l'ensemble des pressions de sélection générées par l'homme sur une espèce d'intérêt économique pour améliorer son rendement de production. Ainsi, des voies d'amélioration du rendement, à savoir des performances de croissance, de la qualité et de la survie de l'huître creuse, sont explorées. Elles s'orientent actuellement vers l'exploitation de la variabilité génétique, la sélection génétique et la triploïdie.

1.3.1 Gestion de la variabilité génétique

Chez *C. gigas*, une partie de la production repose encore sur le captage en milieu naturel de naissain issu de stocks sauvages et cultivés et cette particularité, même si elle ne fait pas l'objet d'une gestion contrôlée, a permis d'éviter l'érosion de la diversité génétique, du moins pour les individus d'élevage issus du recrutement naturel (Taris, *et al.*, 2006b). La gestion de la variabilité génétique du naissain et des stocks de géniteurs d'écloserie demande quant à elle à être examinée avec attention puisque des récents travaux ont montré que:

- l'huître creuse présente un fort fardeau génétique qui contribue à l'expression de la dépression de consanguinité lors de croisements impliquant un petit nombre de géniteurs (Bierne, *et al.*, 2000; Launey et Hedgecock, 2001).
- les pratiques d'élevages tendent à éroder la diversité génétique initiale (effet du tamisage sélectif sur la taille en élevage larvaire) (Taris, *et al.*, 2006a).

1.3.2 Sélection génétique

Crassostrea gigas est une espèce sauvage, et sa domestication est un objectif majeur des programmes d'amélioration génétique. La sélection génétique consiste à sélectionner des géniteurs présentant des valeurs supérieures pour des caractères d'intérêt et de s'assurer de la transmission de ceux-ci à la descendance. De nombreux travaux ont montré qu'il existe une variabilité génétique pour des caractères d'intérêt aquacole et des possibilités de sélection pour ces caractères. Or les caractères contrôlant le rendement de production aquacole sont pluri-alléliques, leur expression dépend de la

valeur génétique des parents, des effets de l'environnement et de leurs éventuelles interactions. Cette notion est traduite dans la formule suivante :

$$VP = VG + VE + VG \times VE,$$

(avec **VP** : variance phénotypique, **VG** : variance génétique et **VE** : variance environnementale).

La faisabilité d'une sélection sur les caractères d'intérêt est testée par l'analyse conjointe de l'appartenance familiale d'un individu et de son trait phénotypique, la corrélation entre les deux renseignant sur le déterminisme génétique du trait. La production en éclosérie de familles à partir de géniteurs identifiés, et les méthodes d'assignation de parenté par marqueurs moléculaires ont permis un développement rapide de cette voie de recherche chez *C. gigas*. Chez l'huître creuse diploïde, de fortes héritabilités sont observées pour les caractères d'intérêts comme par exemple la croissance et la survie aux mortalités estivales (Dégremont, *et al.*, 2010) (cf. paragraphe 2.2.4 de l'introduction générale).

1.3.3 Triploïdie

Chez les huîtres, l'induction de la triploïdie constitue l'une des méthodes les plus employées pour augmenter les rendements de production par l'amélioration d'un phénotype avantageux (Piferrer, *et al.*, 2009). Chez l'huître creuse *C. gigas*, la triploïdie a été induite dès la fin des années 80 (Nell, 2002). Les huîtres triploïdes rencontrent un succès croissant en ostréiculture et représenteraient 50 à 60% des huîtres consommées en France en 2007. Différentes techniques permettent l'obtention d'individus triploïdes, qui possèdent trois jeux de chromosomes haploïdes (3n). Les huîtres triploïdes peuvent être obtenues par induction chimique ou par croisement (Figure 13).

Induction par voie chimique

La cytochalasine B est un inhibiteur qui permet la rétention d'une paire de chromosomes se trouvant dans le globule polaire, lors de la division de l'œuf. Il est possible d'obtenir des huîtres triploïdes par rétention du premier ou du deuxième globule polaire. Cependant, la rétention du deuxième globule polaire (ce qui correspond à l'inhibition de la méiose II) est utilisée préférentiellement puisqu'elle se traduit par de meilleures performances (survie et croissance) des élevages larvaires. Les individus ainsi obtenus sont dits « triploïdes chimiques » (3nCB pour Cytochalasine B). La triploïdie peut également s'obtenir par l'inhibition du premier ou du second globule polaire avec le 6-diméthylaminopurine (6-DMAP) (Beaumont et Fairbrother, 1991). Cependant, la dangerosité des produits cytobloquants et les fortes mortalités qu'ils induisent en phase larvaire ont encouragé le développement de nouvelles techniques d'induction.

Obtention par croisement

Les individus triploïdes peuvent aussi être obtenus par croisement entre un mâle tétraploïde ($4n$) et une femelle diploïde ($2n$). Cette dernière technique est aujourd'hui la plus employée par les écloséries privées pour la production du naissain triploïde. Des lignées de géniteurs tétraploïdes ($4n$) sont produites par induction de la rétention d'un globule polaire (à l'aide des mêmes traitements cytobloquants que ceux employés pour l'induction directe de la triploïdie) lors du croisement d'une femelle triploïde avec un mâle diploïde, ou d'une femelle diploïde avec un mâle triploïde. Ces individus tétraploïdes sont fertiles et peuvent donc être reproduits entre eux afin de maintenir les lignées. Les individus obtenus sont dits « triploïdes naturels » ($3nDT$ pour Diploïdes par Tétraploïdes) (Beaumont et Fairbrother, 1991).

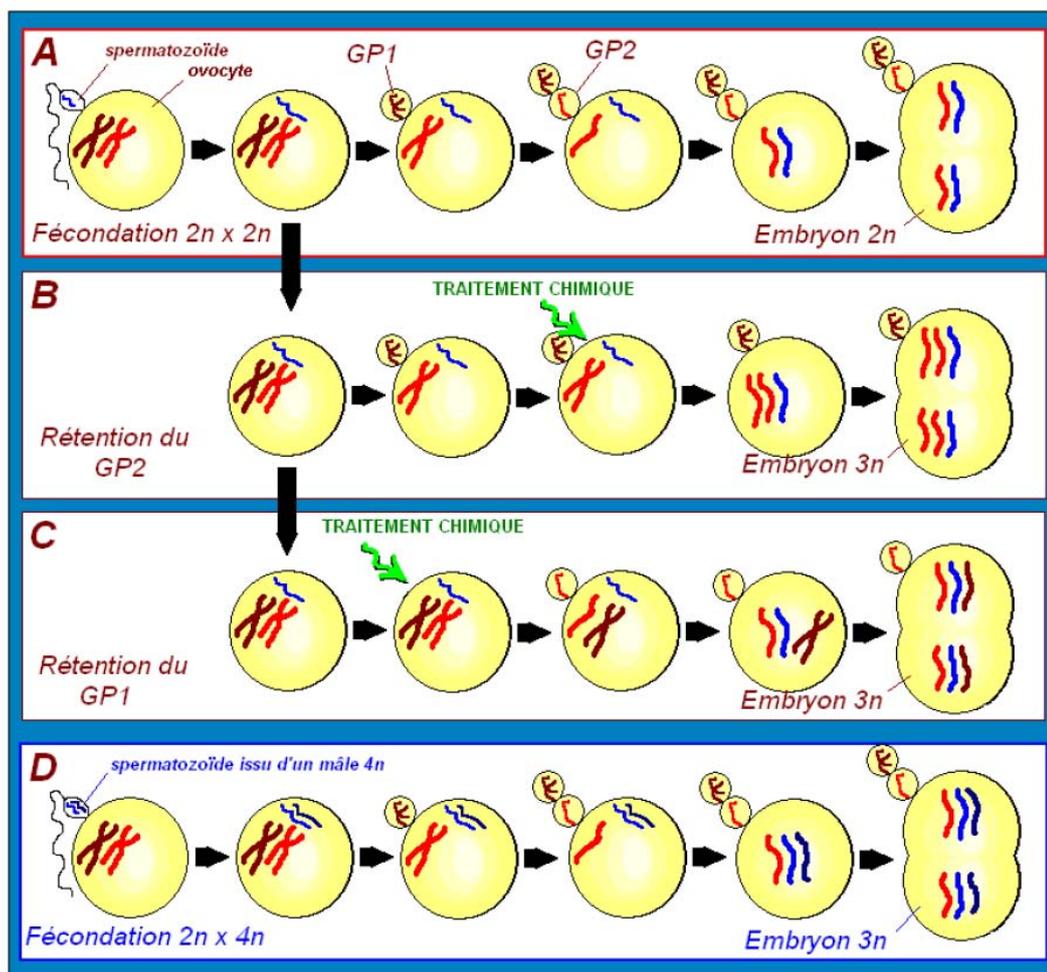


Figure 13 : Schéma de la fécondation et de la ségrégation chromosomique, lors d'un croisement $2n \times 2n$ (A), lorsqu'un traitement chimique est appliqué pour l'obtention d'embryons triploïdes par rétention du 2^{ème} globule polaire (B), du 1^{er} globule polaire (C), lors d'un croisement $2n \times 4n$ (D) (Normand, 2009).

Comme observé chez un grand nombre de végétaux et animaux cultivés triploïdes, cette manipulation du matériel chromosomique affecte chez *C. gigas* l'ensemble des fonctions

physiologiques, à savoir la croissance, la reproduction et la survie. Il a ainsi été clairement montré que les huîtres triploïdes présentaient une réduction forte mais variable de l'effort reproducteur (Normand, *et al.*, 2009). De plus, elles présentent également une croissance plus rapide que les huîtres diploïdes (Allen et Downing, 1986; Nell et Perkins, 2005). Par conséquent, sur un cycle de production, le rendement des huîtres triploïdes est supérieur à celui de leurs équivalents diploïdes. La réduction de la gamétogenèse permet également une meilleure commercialisation de ces huîtres pendant la période de reproduction des diploïdes, et limite leur propagation dans l'environnement naturel (à ce jour, il n'existe aucune preuve de reproduction d'huîtres triploïdes dans le milieu naturel). Enfin, même si une étude rapporte des meilleures performances de survie aux mortalités estivales des huîtres triploïdes comparées aux huîtres diploïdes (Boudry, *et al.*, 2008), il existe cependant des données divergentes à ce sujet (Cheney, *et al.*, 2000) rendant les avantages de la triploïdie pour la survie aux mortalités estivales dépendantes des conditions environnementales et expérimentales. Il est néanmoins important de noter qu'il n'existe qu'un nombre limité d'études portant sur la caractérisation des performances physiologiques et sur l'allocation énergétique aux différentes fonctions chez les mollusques triploïdes.

Enfin, en ce qui concerne les organismes triploïdes, la littérature laisse présager d'une amélioration génétique plus complexe. Par exemple, chez les salmonidés, une interaction entre la ploïdie de la descendance et les valeurs génétiques des parents a été démontrée : en effet, les valeurs des traits phénotypiques de la descendance ne sont pas strictement la résultante des valeurs génétiques des parents (Blanc, *et al.*, 2001). La sélection de géniteurs diploïdes présentant des caractères d'intérêt ne permet donc pas de s'assurer de la transmission de ceux-ci à la descendance triploïde. Dans le cas où la triploïdie influence la valeur du trait phénotypique sélectionné indépendamment de la valeur génétique des parents, il deviendrait donc nécessaire de choisir les futurs reproducteurs diploïdes sur la base des résultats de leur descendance triploïde elle-même.

1.4 Système immunitaire et mécanismes de défense

Comme chez tous les invertébrés, le système immunitaire de l'huître est dans l'état actuel des connaissances, inné, et donc non adaptatif, c'est-à-dire qu'il ne semble pas faire intervenir de processus de mémorisation de la réponse immunitaire. Les défenses de l'huître sont alors essentiellement non spécifiques et basées sur les activités d'un seul type de cellules circulant dans les tissus et les fluides extrapalléaux : les hémocytes (Cheng, 1996).

Le système immunitaire repose communément sur deux types de réactions, l'une à médiation cellulaire par l'intervention de cellules phagocytaires et l'autre à médiation humorale par l'action d'effecteurs solubles. Ces deux types de réactions concourent au déclenchement des trois étapes essentielles des mécanismes de défense de l'hôte : 1. la détection et la reconnaissance de l'agent infectieux, 2. la transmission du signal induisant l'exocytose de granules intracellulaires et l'activation de voies de signalisation intracellulaire et 3. la mobilisation des cellules (mécanismes de phagocytose et prolifération) et la libération et la néosynthèse des effecteurs immunitaires tels les peptides antimicrobiens et les inhibiteurs de protéases.

De nombreuses études visant une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'immunité des bivalves, principalement huîtres, palourdes et moules, ont fait l'objet de plusieurs revues de synthèse (Fisher, 1986; Cheng, 1996; Chu, 2000; Bachère, *et al.*, 2004). Cependant, les données concernant les différents composants des réactions de défense chez les bivalves restent encore fragmentaires, comparées à celles concernant des invertébrés modèles comme *Drosophila melanogaster* (Leclerc et Reichhart, 2004) ou en encore *Caenorhabditis elegans* (Schulenburg, *et al.*, 2004). Même si quelques études sont basées sur des approches *in vivo*, les approches *in vitro* restent les plus nombreuses et sont orientées principalement sur la caractérisation de l'effet d'une stimulation du système immunitaire par mise en contact de cellules immunitaires avec des agents infectieux ou leurs constituants. L'étude des mécanismes mis en jeu suite à une stimulation de ce type n'intègre pas la complexité dynamique des interactions entre les deux antagonistes vivants, l'hôte et l'agent infectieux, ni leur évolution.

Par ailleurs, les approches de génomique et transcriptomique développées au cours de ces dernières années ont permis, par la recherche d'homologies de séquences de gènes déjà décrits dans des bases de données existantes :

1. de mettre en évidence l'existence de gènes potentiellement impliqués dans les mécanismes de défense et ainsi d'identifier des effecteurs immunitaires ou des catégories

fonctionnelles potentiels (banques d'ADN complémentaires -ADNc- et programme EST - Expressed Sequence Tag-) et,

2. d'identifier des gènes différentiellement exprimés entre des échantillons biologiques (organismes, tissus) soumis à diverses conditions et notamment à une pression pathogénique (DD-RT-PCR : Differential Display Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, SSH : Suppressive Subtractive Hybridization, SAGE : Serial Analysis of Gene Expression).

Chez *C. gigas*, une banque d'ADNc a été construite à partir d'hémocytes collectés sur des animaux (dans la cavité péricardique) 12 heures après une injection intramusculaire d'un mélange de vibrions (*V. anguillarum*, *V. metshnikovii*, *V. tubiashii* et *V. splendidus* S322) (<http://www.ifremer.fr/GigasBase/>) (Gueguen, *et al.*, 2003). Les séquences d'ADNc identifiées et classées en différentes catégories de fonctions putatives sont regroupées dans une base de données publique, regroupant l'ensemble des informations issues de travaux réalisés dans le cadre de trois différents projets de séquençage d'ADNc de *C. gigas* (Marine Genomics Europe, Genoscope, Aquafirst) (http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/Crassostrea_gigas/index.html) (Fleury, *et al.*, 2009). Certaines de ces séquences ont été utilisées au cours de cette thèse pour permettre l'étude de la réponse au niveau transcriptionnel d'huîtres infectées par les deux vibrions pathogènes *V. splendidus* et *V. aestuarianus* grâce à une modalité d'infection expérimentale non invasive (cf. chapitre 3).

1.4.1 La réponse cellulaire

La réponse cellulaire est assurée par les hémocytes qui se déplacent dans le système circulatoire de l'huître et migrent dans les tissus sous l'action de stimuli chimiotactiques (Howland et Cheng, 1982). Deux types d'hémocytes sont morphologiquement distingués dans l'hémolymphe : les granulocytes basophiles et éosinophiles très riches en granules intracytoplasmiques et les hyalinocytes qui n'en possèdent peu ou pas (Figure 14) (Cheng, 1981). Par leur capacité à être recrutés sur les sites de lésions ou d'infections et à s'y agréger, les hémocytes sont impliqués dans de nombreux processus vitaux, comme la digestion et le transport de nutriments, la respiration, l'excrétion, mais aussi dans la réparation de lésions tissulaires ou coquillière et enfin, dans les réactions de défenses immunes (Sminia et Van Der Knaap, 1987; Feng, 1988; Cheng, 1996; Hine, 1999; Chu, 2000). Chez les huîtres, aucun site d'hématopoïèse n'a été identifié à ce jour alors que des phénomènes de prolifération hémocytaire sont régulièrement observés par différentes techniques de comptage cellulaire (histologie, microscopie, cytométrie en flux).

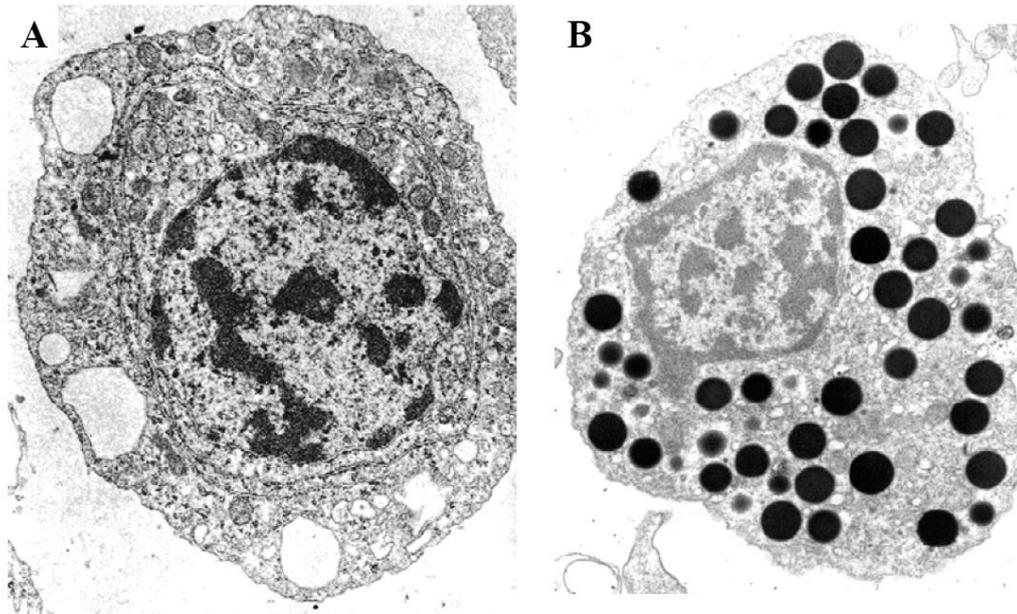


Figure 14 : Différents types hémocytaires chez *Crassostrea gigas* (Microscopie Electronique à Transmission) : **A** : Hyalinocyte ; **B** : Granulocyte (Bachère, *et al.*, 2004).

En l'état actuel des connaissances, les hémocytes sont les seules cellules douées de capacité de défense vis-à-vis d'agents pathogènes (bactéries, virus, parasites) aussi bien chez les mollusques que chez les crustacés. Cette stratégie de défense repose principalement sur un système de phagocytose actif, assuré vraisemblablement par les granulocytes et couplé à la production d'espèces oxygénées réactives (ROS), et sur des mécanismes d'encapsulation de particules de grande taille (supérieure aux hémocytes). Cette dernière stratégie de défense, qui consiste à un recouvrement du corps étranger par des hémocytes organisés en couches successives et structurés par la sécrétion de fibres, a été étudiée chez les huîtres *C. virginica* (Cheng, 1996) et les palourdes *Tapes semidecussatus* (Montes, *et al.*, 1995) infectées par des protozoaires parasites. Impliquée dans les réactions de défense vis-à-vis des infections parasites, l'encapsulation n'a jamais été décrite chez *C. gigas* et ne sera pas détaillée dans ces rappels ; seules la phagocytose et la production de ROS seront rapportées dans les paragraphes ci-dessous.

1.4.1.1 La phagocytose

Ce système d'élimination de particules étrangères de petite taille, commun aux vertébrés et aux invertébrés, a été observé dans les hémocytes de plusieurs mollusques, tels que la moule (Carballal, *et al.*, 1997), la palourde (Lopez, *et al.*, 1997) et l'huître (Cheng, 1996). Il peut être

décomposé en trois phases : une phase de reconnaissance et de signalisation de la particule étrangère, une phase d'internalisation à proprement parler et enfin une phase de dégradation intracellulaire (Figure 16).

La reconnaissance du non-soi par les hémocytes reposerait sur un système de récepteurs membranaires et de molécules capables de reconnaître des motifs structuraux conservés spécifiques de microorganismes. Chez les mollusques et notamment chez *C. gigas*, plusieurs molécules de reconnaissance ont été identifiées dans l'hémolymphe comme des lectines (Olafsen, *et al.*, 1992) et des protéines de liaison aux lipopolysaccharides LPS (Gonzalez, *et al.*, 2005). Une protéine de type LBP (pour LPS binding protein, désignée *Cg-LBP*) a été isolée du plasma de *C. gigas* et un gène codant une protéine de type BPI (pour Bactericidal permeability-increasing protein, désignée *Cg-BPI*) a été caractérisé à partir du programme d'EST précédemment évoqué (Gonzalez, *et al.*, 2005; Gonzalez, *et al.*, 2007c). Ces dernières interviennent dans les processus de reconnaissance mais également dans la neutralisation des particules étrangères. De plus, la protéine majoritaire du plasma décrite chez *C. gigas*, *Cg-EcSOD* (*C. gigas* Extracellular SuperOxyde Dismutase) produite par les hémocytes, présenterait de multiples activités et notamment une activité de liaison aux hémocytes, probablement *via* le site β -intégrine identifié (Gonzalez, *et al.*, 2005) (cf. paragraphe 1.4.1.2).

Les lectines, quant à elles, sont capables de se lier aux sucres présents à la surface des microorganismes. Possédant un large spectre de reconnaissance, ces molécules présentent diverses fonctions, comme l'agglutination (immobilisation des microorganismes évitant leur dissémination), l'opsonisation (recouvrement de la surface du microorganisme pour favoriser sa phagocytose) et enfin la liaison des particules étrangères avec les hémocytes.

Chez les vertébrés, le complexe LPS/LBP fixé à un récepteur CD14 active un récepteur Toll présent à la surface des macrophages, qui conduit à la mobilisation des voies de signalisation comme la voie d'activation Rel/NF- κ B induisant l'expression de gènes ciblés impliqués dans l'immunité et la réponse inflammatoire (Ghosh, *et al.*, 1998; May et Ghosh, 1998; Perkins, 2000). La découverte de voies NF- κ B fortement conservées chez des organismes aussi éloignés phylogénétiquement que la drosophile et les mammifères a permis de faire l'hypothèse d'une voie conservée au cours de l'évolution (Baeuerle et Henkel, 1994; Hoffmann, *et al.*, 1999; Hoffmann et Reichhart, 2002). Certains éléments de ces voies ont depuis été caractérisés chez des plantes, et chez d'autres invertébrés. Par comparaison à ce système de signalisation, il a pu être identifié chez *C. gigas* différents gènes codant pour des éléments clés de cette voie comme *Cg-Rel* (Montagnani, *et al.*, 2004) ou *Cg-I κ B* (Montagnani, *et al.*, 2008) alors que d'autres éléments ont été partiellement caractérisés à partir du programme EST, comme *Cg-Myd88* ou en encore deux récepteurs Toll. Ainsi, les différents éléments de la voie caractérisés chez *C. gigas* (Montagnani, 2002) couplés aux données apportées par le

programme d'EST a permis de proposer pour la première fois un schéma d'une voie de signalisation Rel/ NF- κ B chez l'huître creuse *C. gigas* (Figure 15) (Montagnani, 2002).

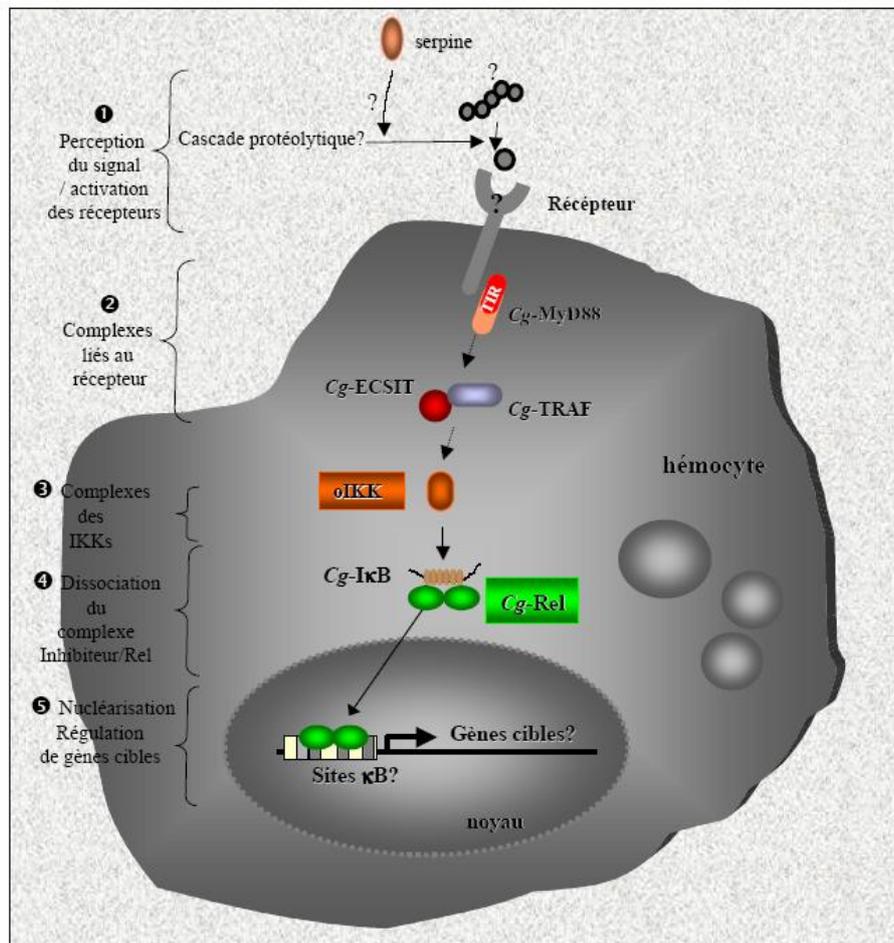


Figure 15 : Schéma d'une voie de signalisation Rel/ NF- κ B chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* proposé par Montagnani (2002).

Les différents éléments caractérisés chez *C. gigas* présentant des homologies à des éléments des voies Rel/NF- κ B sont présentés. Par analogie avec les voies Toll/IMD de la drosophile et la voie NF- κ B des mammifères, ces éléments ont été replacés au sein d'une voie de signalisation : l'étape de perception du signal (1), l'étape de recrutement de molécules adaptatrices liées au récepteur (2), l'étape de conduction du signal *via* une cascade de kinase convergeant vers le complexe des IKKs (3), l'étape de dissociation du facteur de transcription (protéine Rel) et de son inhibiteur (4), et enfin, l'étape de nucléarisation et d'activation de la transcription de gènes cibles (5).

Suite à la reconnaissance et à la signalisation des particules étrangères, les hémocytes peuvent les internaliser par phagocytose : plusieurs modèles d'internalisation par les hémocytes de bivalves ont été proposés par Cheng (1981; Cheng, 1996; Cheng, 2000) faisant tous intervenir des phénomènes de remaniement du cytosquelette. Que ce soit par l'intermédiaire de pseudopodes, de filopodes ou de vacuoles d'endocytose, l'issue de ce processus est l'entrée des particules étrangères dans un phagosome.

Après l'internalisation dans le phagosome, celui-ci fusionnerait avec les lysosomes pour donner un phagolysosome. La dégradation de la particule étrangère se fait par l'action d'espèces réactives de l'oxygène (cf. paragraphe 1.4.1.2) et de molécules cytotoxiques comme des enzymes lysosomiales, des hydrolases, des acides ou des protéines cationiques (Roch, 1999; Chu, 2000; Bachère, *et al.*, 2004). Associés à ce processus de dégradation, des granules de glycogène sont synthétisés à partir des sucres de la particule phagocytée et accumulés dans le phagolysosome. La membrane de ce dernier se désagrègeant, les granules de glycogène sont libérés dans le cytoplasme, éventuellement excrétés de la cellule hémocytaire par l'intermédiaire de vésicules puis dirigés vers le métabolisme des glucides.

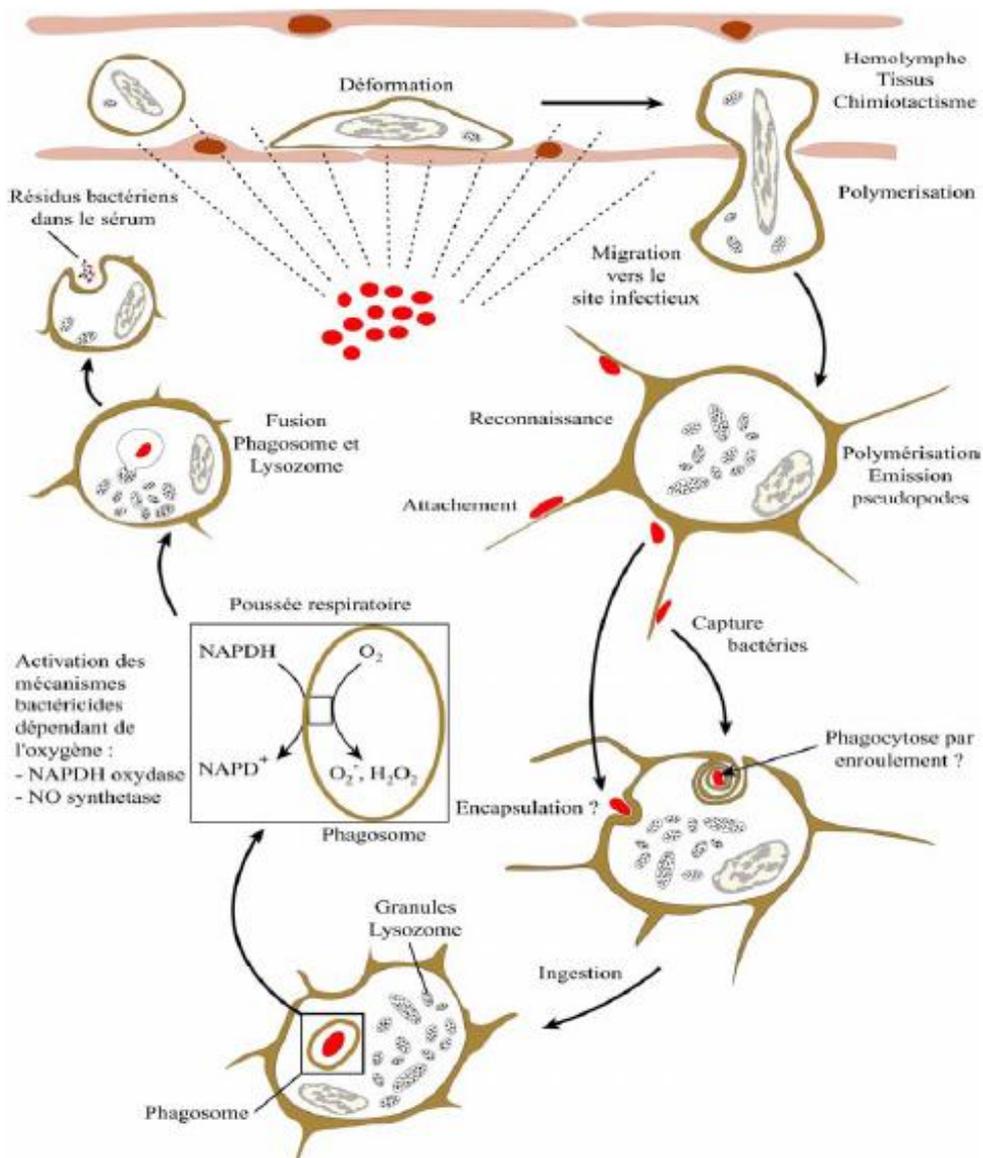


Figure 16 : Représentation schématique du processus de phagocytose et des processus de dégradation des particules phagocytées (Paillard, 2004).

1.4.1.2 La production d'espèces oxygénées réactives

Plus connue sous le nom de « flambée oxydative » ou « respiratory burst » (Chu, 2000), cette activité couplée à la phagocytose ou initiée après stimulation des hémocytes par des agents microbiens, conduit à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species) regroupant, $^1\text{O}_2$, O_2^- , OH^- , NO , OCl^- , et la molécule H_2O_2 (Figure 17). Ces radicaux oxygénés et le peroxyde d'hydrogène sont hautement réactifs (leur orbitale externe est non saturée) et instables et présentent des propriétés microbicides participant à la destruction des corps étrangers. La production de ROS a été mise en évidence chez de nombreuses espèces de bivalves dont *C. gigas* (Delaporte, *et al.*, 2003; Lambert, *et al.*, 2003; Bachère, *et al.*, 2004; Labreuche, *et al.*, 2006a).

Le phénomène débute par une réaction de réduction d'une molécule d'oxygène en anion superoxyde (O_2^-) par la NADPH oxydase qui s'accompagne d'une augmentation de la consommation en oxygène par les hémocytes. L'anion superoxyde est alors converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la superoxyde dismutase (SOD) et également sous formes de radicaux hydroxyles (OH^-) ou d'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) (Figure 17) (Bogdan, *et al.*, 2000a; 2000b).

Les ROS peuvent également réagir avec d'autres composés de l'hôte pour former des substances encore plus toxiques. La myéloperoxydase présente dans le phagosome catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en acide hypochloreux (HOCl). De plus, la production d'oxyde nitrique (NO) par les hémocytes de *C. gigas*, pouvant intervenir dans différents processus physiologiques et pathologiques (Moncada, *et al.*, 1991), a été mise en évidence par Nakayama et Maruyama (1998).

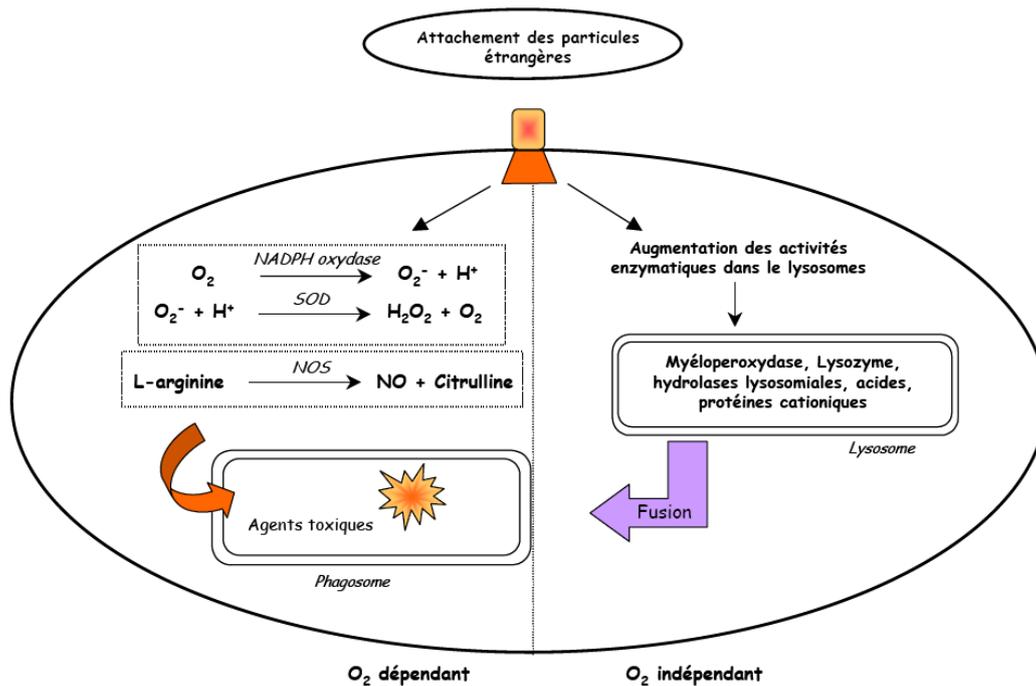


Figure 17 : Représentation des processus de dégradation intracellulaire intervenant après phagocytose d'une particule étrangère par les hémocytes (d'après (Delaporte, 2005).

NADPH oxydase : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate oxydase, SOD : Superoxyde dismutase, NOS : Oxyde nitrite synthétase.

La production de ROS constitue donc un système de défense hautement toxique pour les agents microbiens : les molécules cytotoxiques formées sont connues pour endommager les membranes plasmiques des cellules, les protéines et les acides nucléiques des agents pathogènes. Cependant, la toxicité de ces produits pouvant également avoir un effet délétère à trop forte concentration pour les tissus de l'hôte, il existe des mécanismes enzymatiques de détoxification capables d'équilibrer ces réactions et d'assurer l'intégrité tissulaire. Deux types d'enzymes seraient impliqués dans ces derniers : des superoxydes dismutases, métalloenzymes dont certaines sont localisées dans le cytoplasme et ont pour cofacteurs le cuivre et le zinc, et la catalase.

Alors qu'un gène codant une superoxyde dismutase de type Cu/ZnSOD a été identifié chez *C. gigas* (Boutet, *et al.*, 2004; Huvet, *et al.*, 2004), des travaux portant sur cette enzyme nommée Cg-EcSOD (*Crassostrea gigas* Extracellular Super Oxyde Dismutase) ont mis en évidence son expression constitutive et de façon spécifique au niveau des hémocytes, ainsi que ses propriétés antioxydantes (Gonzalez, *et al.*, 2005). Une fois libérée dans l'hémolymphe, elle possède de plus une activité de liaison aux LPS (Lipopolysaccharides de la paroi des bactéries Gram négatif) et sa séquence amino-acide présente un motif RGD (arginine-glycine-aspartate) reconnu par les intégrines, récepteurs transmembranaires permettant des interconnexions cellule-cellule et cellule-protéine : une immunocolocalisation de la protéine purifiée a montré que celle-ci se lie aux hémocytes au niveau

d'un récepteur de type β -intégrin (Gonzalez, *et al.*, 2005). Cette protéine majoritaire du plasma semble être impliquée dans de nombreux processus physiologiques et immunologiques, comme la détoxification cellulaire et l'adhésion cellulaire.

1.4.2 La réponse humorale

Conjugué à ce système de défense cellulaire, la réponse humorale chez les invertébrés fait intervenir un grand nombre de molécules effectrices solubles telles que les inhibiteurs de protéases (Montagnani, *et al.*, 2007a), les peptides antimicrobiens (Gueguen, *et al.*, 2006; Gonzalez, *et al.*, 2007a; 2007b), des molécules de reconnaissances telles des lectines (Pipe, 1990), des enzymes hydrolytiques d'origine lysosomiale et probablement un système d'activation de la prophénoloxydase (Hellio, *et al.*, 2007) par analogie avec celui bien caractérisé chez les arthropodes (Soderhall et Smith, 1983; Gonzalez, *et al.*, 2007a). Ces effecteurs peuvent être répartis en deux catégories : les molécules issues de cascades protéolytiques (le système du complément, la cascade de coagulation ou encore la cascade d'activation de la prophénoloxydase) qui conduisent à la formation de complexes cytotoxiques et les effecteurs à action cytotoxique directe (inhibiteurs de protéases et peptides et protéines anti-microbiens).

1.4.2.1 Activation de la prophénoloxydase

Décrite initialement chez les mammifères (Hearing et Tsukamoto, 1991) et les arthropodes (Cerenius et Soderhall, 2004), la cascade d'activation de la prophénoloxydase est la seule documentée à ce jour chez les mollusques marins (Cong, *et al.*, 2005). Elle est étudiée chez *C. gigas* (Luna-Gonzalez, *et al.*, 2003; Hellio, *et al.*, 2007; Luna Acosta, *et al.*, 2009), chez qui des activités de type phénoloxydase ont été mises en évidence dans l'hémolymph. Cette cascade d'activation est impliquée au cours du processus d'internalisation des agents pathogènes par les hémocytes et conduit à la formation de mélanine et de composés intermédiaires bactéricides. Elle implique une cascade de sérines protéases activées par la présence de particules étrangères d'origine bactérienne (LPS, PGN ou peptidoglycanes) ou de lésions tissulaires. Cette cascade active elle-même par digestion protéolytique un précurseur inactif, la prophénoloxydase (Figure 18). La phénoloxydase active aboutit à la conversion de composés phénoliques en quinones, qui sont à la base des polymères bactéricides comme la mélanine ou la *o*-quinone.

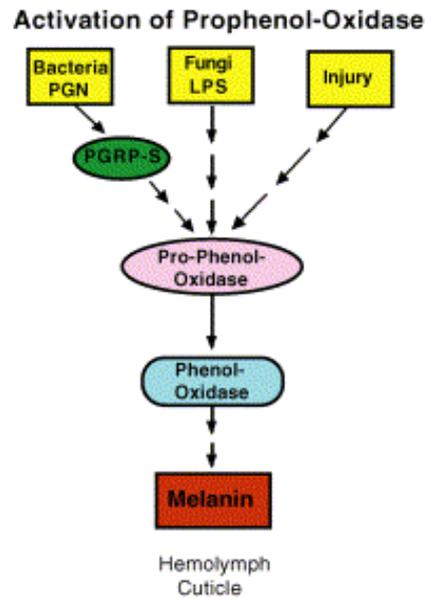


Figure 18 : Schéma du système d'activation de la prophénoloxydase chez les insectes (Dziarski, 2004).

1.4.2.2 Inhibiteurs de métalloprotéases

Chez les vertébrés, les inhibiteurs de protéases, et notamment les inhibiteurs de métalloprotéases (TIMP ou Tissue Inhibitor of Metalloproteinase), participent à de nombreux processus physiologiques (embryogenèse, réparation de lésions, angiogénèse) et pathologiques (inflammation, cancer) (Matrisian, 1990; Gomez, *et al.*, 1997). Protéines multifonctionnelles, les TIMP ont pour rôle principal de réguler l'action des métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMPs) lors de la réaction inflammatoire (Nagase et Woessner, 1999; Brew, *et al.*, 2000).

Chez les invertébrés, les inhibiteurs de protéases semblent participer aux mécanismes de défense et peuvent agir à différents niveaux de la réponse immunitaire : ils sont notamment impliqués dans la cascade prophénoloxydase, mais ils peuvent également être à l'origine d'activités inhibitrices dans l'hémolymphe dirigées directement contre des protéases d'agents pathogènes. Des études menées chez la larve de *Galleria mellonella* ont clairement montré ce rôle direct de TIMPs en tant qu'effecteurs immunitaires par leur induction suite à une injection de métalloprotéases (Griesch, *et al.*, 2000).

Chez *C. gigas*, deux gènes codant des protéines de la famille des TIMPs ont été identifiés (Montagnani, *et al.*, 2001; Montagnani, *et al.*, 2005). Ces deux gènes sont exprimés spécifiquement par les hémocytes et en réponse à une agression externe, comme une lésion de la coquille, ou une injection expérimentale de *Vibrio* (Montagnani, *et al.*, 2001), suggérant l'implication de ces TIMPs dans les réactions humérales chez *C. gigas*. De plus, l'injection de produits extracellulaires (ECP) de

quatre différentes souches de *Vibrio* ou d'une métalloprotéase purifiée chez la bactérie Gram positif *Bacillus polymixa* induit une accumulation d'ARNm de *Cg-TIMP* (*Crassostrea gigas* Tissue Inhibitor of Metalloproteinase) dans les hémocytes des huîtres injectées (Figure 19) (Montagnani, *et al.*, 2007b).

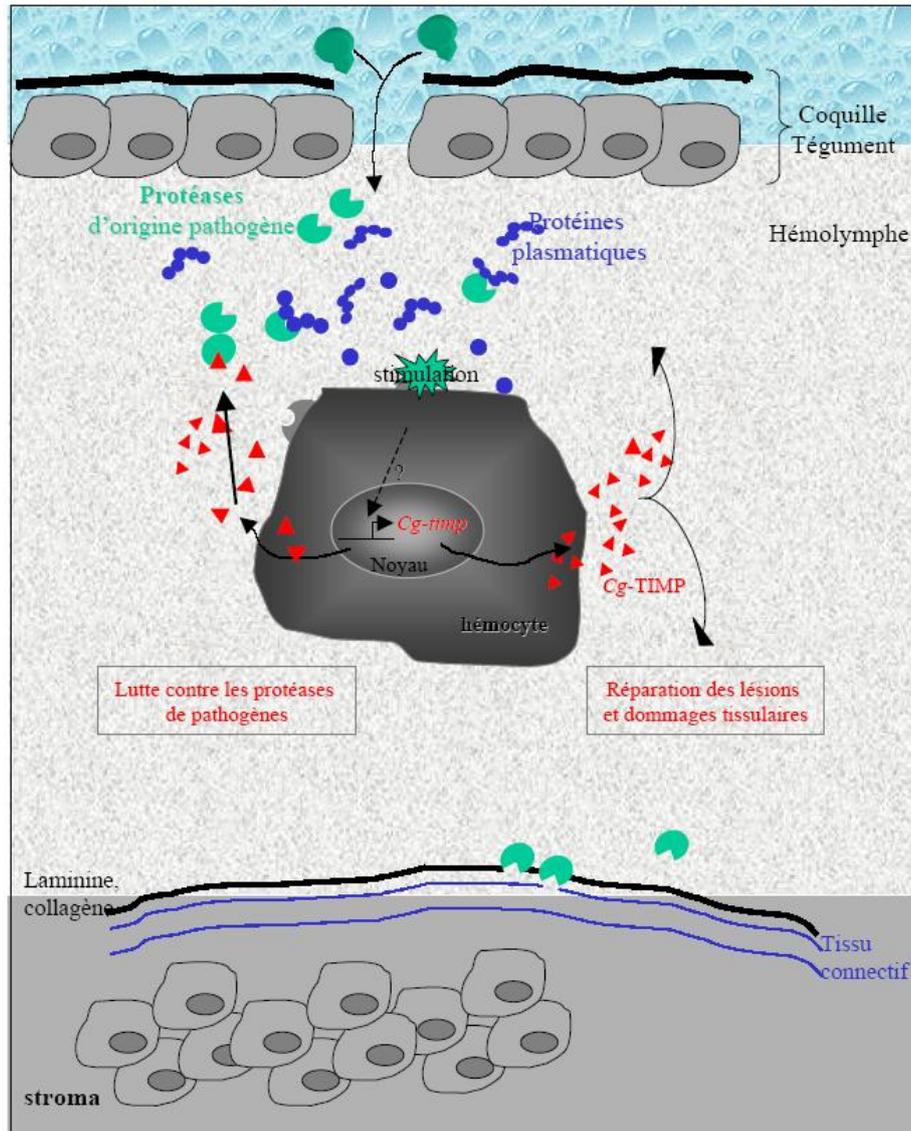


Figure 19 : Modèle d'implication de *Cg-TIMP* dans les réactions de défense de *Crassostrea gigas* proposé par Montagnani (2002).

Dans ce modèle, *Cg-TIMP* pourrait jouer un rôle direct sur des facteurs de virulence métalloprotéasiques d'agents pathogènes. Cette réponse serait induite directement en réponse à l'infection. La voie de signalisation impliquée dans la régulation de l'expression de *Cg-timp* reste inexplorée. La production de *Cg-TIMP* serait ensuite dirigée contre les métalloprotéases d'agents pathogènes ou impliquée dans la régulation des dommages tissulaires.

1.4.2.3 Peptides et protéines anti-microbiens

Effecteurs immunitaires conservés dans les phyla du règne vivant, les peptides antimicrobiens ont été présentés dès les années 1920 suite à l'observation chez les insectes d'une immunité humorale puissante capable d'agir directement pour supprimer les bactéries. La preuve formelle de l'existence des peptides antimicrobiens a été apportée par la caractérisation du premier d'entre eux, la cécropine, purifiée du papillon *Hyalophora cecropia* par Hans Boman (1981). Ces peptides sont de petites protéines réparties en différentes familles ayant chacune des propriétés particulières : elles présentent des spectres d'action antimicrobiens (bactéries Gram positif, Gram négatif, champignons) et des modes d'actions divers et variés (intracellulaire, extracellulaire, local, systémique).

Concernant les mollusques bivalves, c'est chez les moules, *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis* qu'il a été identifié pour la première fois des peptides antimicrobiens (Mitta, *et al.*, 1999; Mitta, *et al.*, 2000a; Mitta, *et al.*, 2000b). Ces peptides présentent des spectres d'activités différents et bien déterminés : défensines et myticines sont dirigées contre les bactéries Gram positif, mytimicines contre les champignons et enfin les mytilines semblent avoir un spectre d'action plus large.

Chez les huîtres, les peptides antimicrobiens découverts à ce jour sont principalement des homologues de défensines. Chez *C. virginica*, la défensine AOD (American Oyster Defensin), produite constitutivement par les hémocytes, présente un large spectre d'activité (Seo, *et al.*, 2005).

Chez *C. gigas*, des approches de génomique ont permis d'identifier différents peptides antimicrobiens de type défensines. La première défensine décrite, la Cg-Defm (pour *C. gigas* defensin mantle), produite au niveau du manteau et de manière constitutive, présente une activité ciblée contre les bactéries Gram positif (Gueguen, *et al.*, 2005).

Deux autres gènes de défensines ont été identifiés au niveau des hémocytes, Cg-Def1 et Cg-Def2 (Gonzalez, *et al.*, 2007b). L'étude des défensines chez *C. gigas*, de leur polymorphisme génétique et de leur activité antimicrobienne en système recombinant, semble montrer une diversité complexe couplée à des activités synergiques contribuant à l'efficacité de la réponse antimicrobienne (Gueguen, *et al.*, 2009; Schmitt, *et al.*, 2010).

Par ailleurs, comme il a déjà été évoqué précédemment (cf. paragraphe 1.4.1.1), un gène codant une protéine de type BPI (pour Bactericidal permeability-increasing protein, désignée Cg-BPI) dont l'activité serait microbicide comme son nom l'indique, a été caractérisé à partir du programme d'EST normalisé d'hémocytes de *C. gigas* (Gonzalez, *et al.*, 2007c).

Enfin, issues de l'analyse de cette même banque, des séquences homologues à la Big-défensine, caractérisée chez la limule *Tachypleus tridentatus*, ont été mise en évidence chez *C. gigas*. Même si leur activité antimicrobienne n'a pas encore été démontrée, des analyses d'expression de trois

formes putatives de Cg-Big-défensines 1, 2 et 3 ont montré une augmentation des niveaux d'expression de deux d'entre elles 12h après stimulation bactérienne (Rosa, *et al.*, 2009).

1.4.3 Facteurs modulant les capacités de défense de l'huître

De nombreux tests *in vitro* ont été développés afin de caractériser les capacités de défense au niveau cellulaire d'une huître ou d'un lot d'huîtres. Les mesures les plus communément effectuées sur un échantillon d'hémolymphe (individuel ou pool) pour décrire la performance potentielle de la réponse à médiation cellulaire sont le comptage des hémocytes circulants totaux, la description de la morphologie des hémocytes, leur capacité phagocytaire et d'adhésion, la production d'espèces oxygénées réactives; des tests de mesures d'activités phénoloxydase ou antimicrobienne permettent une caractérisation de la performance potentielle de la réponse à médiation humorale. Chez *C. gigas*, des études se sont portées sur l'analyse de ces paramètres hémocytaires de différents échantillons issus d'huîtres de diverses provenances, soumises à différents stress et conditions environnementales. Il a été montré d'importantes variations de ces paramètres, modulés par différents types de facteurs environnementaux ou pathogéniques (Delaporte, *et al.*, 2003; Gagnaire, *et al.*, 2004; Soletchnik, *et al.*, 2005; Gagnaire, *et al.*, 2006a; Gagnaire, *et al.*, 2006c; Labreuche, *et al.*, 2006a; Delaporte, *et al.*, 2007; Gagnaire, *et al.*, 2007; Kim, *et al.*, 2007; Allen et Burnett, 2008; Samain et McCombie, 2008). De plus, les caractéristiques biologiques propres aux mollusques bivalves (poïkilothermes, possédant un système circulatoire semi-ouvert, osmo- et thermoconformes) (Cheng, 1981) les exposent directement aux fluctuations de l'environnement, aux variations de température et de salinité, ou à divers polluants. Ainsi, si ces paramètres hémocytaires apparaissent comme des descripteurs biologiques d'intérêt pour la compréhension des mécanismes de défense et de leur modulation, il est difficile de les considérer comme des descripteurs de santé « absolus » du fait de leur grande variabilité inter-individuelle observée sur de courtes échelles spatio-temporelles.

Par ailleurs, l'huître comme de nombreux invertébrés marins est naturellement peuplée d'une microflore bactérienne riche, à la surface comme à l'intérieur des organes et tissus comme l'hémolymphe. Cette microflore bactérienne peut être utilisée comme ressources trophiques ou bien participer aux activités digestives et elle pourrait également avoir un rôle de probiotique, par exclusion compétitive ou par stimulation du système immunitaire. Le genre *Vibrio* est le genre cultivable majoritaire de la microflore normale de l'huître creuse même si les genres *Achromobacter*, *Flavobacterium* et *Pseudomonas* sont également représentés (Colwell et Liston, 1960b; Prieur, 1981b; 1981a). Certaines espèces ont notamment été isolées de l'hémolymphe d'huître creuse *C. gigas* telles que *V. gigantis* (Le Roux, *et al.*, 2005) et *V. crassostreae* (Faury, *et al.*, 2004) et se sont révélées

virulentes chez *C. gigas* en infection expérimentale. Si la plupart des vibrions sont des bactéries commensales de nombreux hôtes marins (Weiner, *et al.*, 1985; Olafsen, *et al.*, 1993; Ortigosa, *et al.*, 1994; Pujalte, *et al.*, 1999; Macián, *et al.*, 2000; Guisande, *et al.*, 2004; Guisande, *et al.*, 2008) et même symbiontes (association *V. fisheri* et calmar *Euprymna scolopes*) (Ruby, 1996; McFall-Ngai, 2000), certains de ces vibrions sont des pathogènes d'animaux marins tels que *V. splendidus*, responsable de septicémies et d'ulcères de la peau chez des poissons marins d'élevage (Austin et Austin, 2007), ou *V. tapetis* responsable de la maladie de l'anneau brun chez la palourde (Borrego, *et al.*, 1996) (cf. paragraphe 2.2). Par ailleurs, les phénomènes de blanchissement du corail seraient également associés à des bactéries du genre *Vibrio* (Rosenberg et Ben-Haim, 2002; Ward et Lafferty, 2004; Rosenberg et Koren, 2006) : *Vibrio shilonii* serait responsable de cette pathologie chez *Oculina patagonica* (Ben-Haim, *et al.*, 1999) et *Vibrio coralliilyticus* provoquerait le blanchiment du corail *Pocillopora damicornis* en Mer Rouge et en Océan Indien (Ben-Haim, *et al.*, 2003). Enfin, depuis quelques années, des bactéries appartenant aux groupes *V. harveyi*, *V. splendidus* et *V. coralliilyticus* déclencheraient des mortalités massives d'invertébrés benthiques en méditerranée et notamment de l'espèce de gorgone *Paramuricea clavata* (Vezzulli, *et al.*, in press).

Cette cohabitation huître/bactéries résidentes implique que l'huître doit posséder un système immunitaire suffisamment discriminant et efficace pour maintenir un équilibre entre les bactéries commensales et pathogènes (Pruzzo, *et al.*, 2005). Cependant, la nature et les mécanismes d'interactions reliant l'huître, ses hémocytes et constituants hémolympatiques notamment, et les *Vibrio* pathogènes ou bénéfiques, de même les interactions reliant les bactéries commensales et les *Vibrio* pathogènes restent méconnus (Prieur, *et al.*, 1990; Canesi, *et al.*, 2002; Pruzzo, *et al.*, 2005). A ce jour, il n'existe aucune étude portant sur la composition spécifique, qualitative et quantitative, des communautés bactériennes associées à l'huître *C. gigas*, sur la variabilité des structures de ces populations sous l'effet de différents paramètres environnementaux ou pathogéniques ou encore sur l'implication de ce microbionte dans les mécanismes de défense de l'animal.

Pour conclure cette partie consacrée à l'huître creuse, en plus de la première barrière physique que peut constituer leur coquille lors de l'exondaison, les mollusques bivalves ont développé des systèmes de défense immunitaires efficaces dont les principaux acteurs sont les hémocytes, cellules immuno-compétentes circulantes multifonctionnelles. L'action conjuguée des mécanismes cellulaires et humoraux a pour rôle la destruction des agents pathogènes et l'enrayement d'une infection. Toutefois, les activités des hémocytes présentent des variations sous l'influence de divers facteurs, environnementaux ou pathogéniques, pouvant expliquer pour partie la variabilité de sensibilité de l'huître aux mortalités estivales. Compte tenu de la difficulté de caractériser l'état de santé d'une huître ou d'un lot d'huîtres et de l'absence d'un indicateur de santé « absolu », il est nécessaire de maintenir les animaux testés dans un même environnement avant expérimentation et de travailler sur des échantillons de grande taille ($n > 30$ individus). Aucune lignées d'huître « standard » n'étant disponible à ce jour, la production d'animaux en conditions contrôlées et régulièrement surveillée tout au long de l'élevage est une alternative *a minima*.

Enfin, la compréhension des maladies infectieuses et notamment des vibrioses expérimentales, ne peut s'affranchir des approches de type « oyster-centred » visant l'étude de facteurs de l'hôte modulant sa sensibilité. Ces approches impliquent non seulement une qualification et au mieux une quantification individuelles des facteurs de l'hôte étudiés et contrastés, mais également la maîtrise d'un protocole d'infection expérimentale reproductible et sensible permettant de soumettre les animaux à une pression pathogénique constante. Ce type d'investigation axée sur la caractérisation de l'hôte sera emprunté au cours de cette thèse dans le but d'évaluer l'effet de trois facteurs de l'hôte, la gonadogenèse, la ploïdie et la génétique sur sa sensibilité aux vibrioses expérimentales.

2 Les bactéries du genre *Vibrio*

L'étude des *Vibrio* affectant les espèces aquacoles et de leurs mécanismes de virulence a bénéficié en premier lieu des connaissances issues des nombreuses recherches menées sur les bactéries du genre *Vibrio* présentant un caractère pathogène chez l'homme. L'espèce la plus étudiée est *V. cholerae*, l'agent étiologique du choléra représentant encore aujourd'hui une menace sérieuse dans les pays où l'accès à de l'eau potable de bonne qualité reste un problème. Décrite en 1854 par l'italien Pacini, *V. cholerae* fut la première bactérie du genre *Vibrio* à être étudiée. Les travaux de Pacini ont été approfondis par Koch quelques années plus tard (1883-1884) et les recherches ne cessent, sur ses origines, son évolution, sa virulence. *V. vulnificus* et *V. parahaemolyticus* responsables d'intoxications alimentaires restent également très étudiés en raison de leur impact non négligeable en santé publique.

Au milieu du XX^{ème} siècle, les microbiologistes marins ont observé la prédominance du genre *Vibrio* sur les cultures bactériennes issues d'échantillons d'eau de mer ou associées à des poissons ou des coquillages. Puis des cas de vibrioses entraînant de lourdes pertes économiques ont émergé dans les élevages aquacoles et les *Vibrio* sont devenus l'objet d'une attention croissante et d'une préoccupation majeure pour l'aquaculture mondiale, aggravée par les caractéristiques biologiques propres à ce genre, abondant et ubiquiste dans le milieu marin, par leur potentiel d'adaptation aux facteurs environnementaux et enfin par le pouvoir pathogène de certaines espèces.

2.1 Biologie des *Vibrio*

2.1.1 Caractéristiques générales

Retrouvées en abondance dans le milieu marin, les bactéries du genre *Vibrio* ou vibrions sont des organismes dont le mode de vie est typiquement aquatique. Elles appartiennent à la classe des γ -*proteobacteria* et à la famille des *Vibrionaceae* qui comprend également les genres *Photobacterium* et *Salinivibrio*. Le genre *Vibrio* regroupe des bactéries Gram négatif, droites ou incurvées, non-sporulées, de 0,5 à 1 μm de diamètre sur 1,2 à 3,5 μm de longueur. Les espèces du genre *Vibrio* sont généralement mobiles en milieu liquide grâce à la présence d'un ou plusieurs flagelles polaires. Cependant certaines en sont dépourvues et immobiles. Elles sont aéro-anaérobies facultatives et présentent un métabolisme oxydatif et fermentatif, et sont le plus souvent oxydase positives, nitrate réductase positives et chimio-organotrophes, fermentant le D-glucose comme source de carbone et d'énergie et utilisant des ions NH_4^+ comme source d'azote. Les *Vibrio* sont cultivables sur milieu non sélectif de la flore

hétérotrophe marine de type « marine agar » formant des morphotypes variables et certains poussent également sur la gélose TCBS (Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose agar) développée à l'origine pour l'isolement sélectif de *V. cholerae*. La quasi-totalité des *Vibrio* exige la présence de sodium dans le milieu, indispensable à la croissance. Chaque espèce présente un *preferendum* thermique pour sa croissance, compris pour la majorité d'entre elles entre 10 et 40°C.

Résidents naturels des environnements aquatiques dont les caractéristiques physico-chimiques modulent la composition et l'abondance des communautés vibrionacées, les *Vibrio* présentent différentes formes de vie : ils peuvent être planctoniques libres dans les océans ou les estuaires, associés à des surfaces biotiques ou abiotiques dans les biofilms ou encore coloniser des organismes hôtes (Kelly et Stroh, 1988; Pujalte, *et al.*, 1999; DePaola, *et al.*, 2003; Thompson, *et al.*, 2004a; Thompson, *et al.*, 2004b; Thompson, *et al.*, 2005; Eiler, *et al.*, 2006; Guisande, *et al.*, 2008; Turner, *et al.*, 2009; Vezzulli, *et al.*, 2009). Leur caractère ubiquiste et la diversité des interactions biologiques observées entre des *Vibrio* et différents hôtes (commensales, endosymbiotiques ou pathogènes) rendent souvent difficile la caractérisation de leur statut vis-à-vis de l'hôte (cf. paragraphe 1.4.3).

2.1.2 Taxonomie

Depuis une trentaine d'années, le nombre d'espèces nouvellement décrites appartenant au genre *Vibrio* a considérablement augmenté. Ainsi en 1980 seules 20 espèces étaient décrites, contre 54 en 2002 et plus de 80 aujourd'hui (Figure 20) (Thompson, *et al.*, 2004a; Thompson, *et al.*, 2006; Thompson, *et al.*, 2007). Jusque dans les années 80, l'identification des espèces du genre *Vibrio* était basée sur des analyses de critères phénotypiques classiques et de taxonomie numérique reposant sur l'utilisation de différents composés comme source de carbone et d'énergie, l'étude des activités enzymatiques, la tolérance au sel, la luminescence, le *preferendum* de température, les antibiogrammes et la composition en GC du génome (Alsina et Blanch, 1994). Cependant, en raison du nombre croissant de nouvelles espèces, de la variabilité génotypique au sein d'une même espèce, de l'absence de tests phénotypiques discriminants et de la versatilité phénotypique de certaines souches, la classification reposant uniquement sur des critères de phénotypie ne permet pas, dans bien des cas, d'identifier avec certitude un isolat bactérien au sein de ce genre. On peut donner pour exemple la complexité du groupe polyphylétique de *V. splendidus* au sein duquel les espèces *V. kanaloe*, *V. lentus*, *V. chagasii* et *V. pomeroy* ne peuvent être distinguées par les outils phénotypiques classiques tels que les galeries API (Le Roux, *et al.*, 2004; Le Roux et Austin, 2006; Le Roux, *et al.*, 2009). Ces mêmes outils ont également conduit à des erreurs de classification taxonomique concernant les

espèces *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* (Owens et Busico-Salcedo, 2006).

Aussi le développement récent d'outils de génotypage moléculaire a révolutionné la taxonomie des procaryotes et permis notamment l'étude des bactéries non cultivables. Les approches moléculaires de caractérisation de l'ADN bactérien sont nombreuses et de plus en plus utilisées comme une alternative au phénotypage classique du fait de leur fort pouvoir discriminant, de leur facilité d'exécution et de la fiabilité des données qu'elles génèrent (Vandamme, *et al.*, 1996; Thompson, *et al.*, 2004a). La première approche utilisée en taxonomie moléculaire a été le séquençage des gènes ribosomiaux (codant les ARNr 5S, 23S et 16S) qui a conduit à la construction d'une nouvelle classification des *Vibrio* (Kita-Tsukamoto, *et al.*, 1993). La comparaison des séquences nucléotidiques obtenues chez différentes souches permet après alignement d'établir les relations phylogénétiques entre souches. Classiquement toutes les souches de *Vibrio* appartenant à une même espèce ont plus de 97% d'homologie dans leur séquence ADNr 16S tandis que le genre *Vibrio* est défini par plus de 95% d'homologie (Kita-Tsukamoto, *et al.*, 1993; Hagstrom, *et al.*, 2002). Cette méthode est congruente avec l'hybridation ADN/ADN qui reste la technique de référence pour la détermination de toute nouvelle espèce procaryote (Wayne, *et al.*, 1987) : le seuil admis est de 70% d'homologie de séquence au niveau des hybridations ADN/ADN (Stackebrandt, *et al.*, 2002). Toutefois, l'analyse unique de la séquence ADNr 16S n'a pas suffi à lever la distinction de certaines souches, et notamment au sein du groupe *V. splendidus* (Le Roux, *et al.*, 2004). Le typage de séquence en multiloci ou MLST (MultiLocus Sequence Typing) basée sur le séquençage de plusieurs gènes de ménage pouvant présenter des vitesses d'évolution phylogénétique différentes selon les espèces considérées (Maiden, *et al.*, 1998; Stackebrandt, *et al.*, 2002) permet l'obtention d'un pouvoir plus discriminant pour la délimitation de la notion d'espèce. Enfin, de plus en plus, les études de taxonomie se tournent vers des approches polyphasiques qui combinent plusieurs techniques de typage comme le phénotypage, l'hybridation ADN/ADN et le séquençage d'un ou plusieurs gènes de ménage.

taille (3Mb), alors que le chromosome II, plus petit (1 et 2 Mb) contient une proportion plus importante de gènes codant des protéines hypothétiques (Heidelberg, *et al.*, 2000). Aujourd'hui les approches de type métagénomique appliquées à la caractérisation de la biodiversité microbienne ouvrent des perspectives prometteuses concernant l'évolution microbiologique au sein de l'environnement marin.

2.2 Vibrioses en aquaculture

En aquaculture marine, les *Vibrio* sont à l'origine de la plupart des pathologies bactériennes touchant tous les types de filières de production, poisson, crustacé ou mollusque. D'autres bactéries sont parfois associées à des épisodes pathologiques, comme certaines α -Protéobactéries proches des Rickettsies, des Rickettsies, plus rarement des Mycobactéries mais leur impact économique demeure très inférieur à celui des vibrioses (Azevedo et Villalba, 1991; Lightner et Redman, 1994; Lightner et Redman, 1998). Les recherches menées au sujet des pathologies des filières aquacoles mondiales ont largement bénéficié des schémas d'étude et de caractérisation des *Vibrio* pathogènes pour l'homme et de leurs facteurs de virulence.

2.2.1 Espèces de *Vibrio* pathogènes chez les poissons

Près d'une vingtaine de *Vibrio* sont aujourd'hui potentiellement impliqués dans des épisodes de mortalités chez les poissons, mais les deux espèces responsables des plus importantes pertes sont *V. anguillarum* et *V. salmonicida*. D'abord décrit comme responsable de la peste rouge des anguilles en 1909 en Mer Baltique, *V. anguillarum* a depuis été associé à de nombreuses autres espèces de poissons, de salmonidés en particulier (Trust, *et al.*, 1986). *V. salmonicida* est l'agent étiologique de la maladie d'Hitra ou vibriose des eaux froides (Egidius, *et al.*, 1981) responsable d'importantes mortalités dans les élevages intensifs de saumons atlantiques *Salmo salar* ou de morues *Gadus morhua* (Jorgensen, *et al.*, 1989). La principale affection causée par ces deux *Vibrio* est une septicémie hémorragique. Par ailleurs, des souches de *Vibrio harveyi* ont été isolées de requins élevés en captivité et présentant des symptômes inquiétants (requin gris *Carcharhinus plumbeus* et requin-citron *Negaprion brevirostris*). Quelques épizooties de vibriose à *Vibrio harveyi* sont de plus en plus décrites chez plusieurs poissons d'élevage (comme les mérours *Epinephelus coioides* et *Epinephelus malabaricus*, les chinchards du Japon *Trachurus japonicus* ou encore les daurades *Sparus auratus*).

Cliniquement les espèces présentent des symptômes variables. Enfin, *V. splendidus* a été associé à des épisodes de mortalité en élevage larvaire de turbot (Nicolas, *et al.*, 1996; Farto, *et al.*, 1999; Gatesoupe, *et al.*, 1999).

2.2.2 Espèces de *Vibrio* pathogènes chez les crustacés

Si l'aquaculture mondiale de la crevette reste florissante, de nombreuses filières de production sont affectées depuis les années 80 par des maladies infectieuses, virales et bactériennes, pouvant toucher les stades larvaires et adulte. La plupart des bactéries pathogènes identifiées appartiennent au genre *Vibrio*, comme, et de façon non exhaustive, *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. penaeicida*, *V. nigripulchritudo* ou encore *V. damsela* (De La Peña, *et al.*, 1992; Song, *et al.*, 1993; Lee, *et al.*, 1997; Costa, *et al.*, 1998; Lightner et Redman, 1998; Goarant, *et al.*, 2006a). Même si quelques pathologies ont été décrites chez le homard (*Jasus verreauxi* et *Homarus americanus*) ou les *Artemia* (*Artemia franciscana*) (Bowser, *et al.*, 1981; Diggles, *et al.*, 2000; Verschuere, *et al.*, 2000a; Soto-Rodriguez, *et al.*, 2003; Tall, *et al.*, 2003), la pénéculture reste la filière la plus touchée par des vibrioses. *V. harveyi* et *V. penaeicida* représentent les agents étiologiques responsables des plus lourdes pertes économiques. Alors que *V. harveyi* est impliqué dans des mortalités de larves et de juvéniles de crevettes du genres *Litopenaeus monodon*, *L. vannamei*, et *Penaeus japonicus* (Liu, *et al.*, 1996; Alvarez, *et al.*, 1998; Aguirre-Guzman, *et al.*, 2001; Austin et Zhang, 2006), *V. penaeicida* est responsable d'une maladie saisonnière appelée « Syndrome 93 » qui touche les élevages de *L. stylirostris* en saison fraîche en Nouvelle-Calédonie (Goarant, *et al.*, 1998; Goarant, *et al.*, 1999; Goarant, *et al.*, 2000). L'abandon des élevages en saison fraîche a entraîné une forte baisse de la production en 1993 et 1994 malgré l'augmentation des surfaces exploitées. Puis en 1998, une nouvelle pathologie bactérienne, appelée « Syndrome d'été » et attribuée à *V. nigripulchritudo*, est apparue sur une ferme de production au cours des élevages d'été réduisant d'un facteur 3 à 4 les survies finales. En 2003 puis 2006, l'apparition de mortalités de type « Syndrome d'été » a été observée sur deux fermes situées à proximité de la première menaçant sérieusement le filière calédonienne (Goarant, *et al.*, 2006a; Goarant, *et al.*, 2006b; Goarant, *et al.*, 2007; Reynaud, 2008; Reynaud, *et al.*, 2008).

2.2.3 Espèces de *Vibrio* pathogènes chez les mollusques

De la même façon, les *Vibrio* apparaissent comme le genre bactérien le plus impliqué dans les épisodes de mortalités dues à des infections bactériennes chez les mollusques.

Peu de données existent faisant état de vibrioses affectant les mollusques céphalopodes : il a cependant été rapporté quelques cas de vibrioses à *V. alginolyticus* affectant la pieuvre *Octopus joubini* (Hanlon, *et al.*, 1984) ou à *V. lentus*, apparenté à *V. splendidus*, affectant les pieuvres sauvages *O. vulgaris* et provoquant des symptômes macroscopiques (lésions de la peau) précédant la mort des individus et facilitant la description de la maladie (Farto, *et al.*, 2003).

Concernant la classe des gastéropodes, plusieurs espèces de *Vibrio* ont été associées à des épisodes de mortalité chez l'ormeau : *V. alginolyticus* a été isolé d'ormeaux malades des espèces *Haliotis rufescens* (Anguiano-Beltrán, *et al.*, 1998) et *H. diversicolor supertexta* (Liu, *et al.*, 2001). Par ailleurs, *V. harveyi (carchariae)* a été associé à une épizootie chez l'ormeau *H. tuberculata* en écloserie (Nicolas, *et al.*, 2002) et probablement à des mortalités massives dans le milieu naturel en France (Travers, *et al.*, 2009), tout comme *V. fluvialis* en Chine (Li, *et al.*, 1998).

Par ailleurs, chez les bivalves de nombreux cas de vibrioses ont été décrits affectant principalement les stades larvaires en écloserie (Tubiash, *et al.*, 1965; DiSalvo, *et al.*, 1978; Elston et Leibovitz, 1980; Jeffries, 1982; Hada, *et al.*, 1984; Paillard, *et al.*, 2004). Notamment, une souche de *V. splendidus* biovar II a été associée à des mortalités de larves d'huîtres creuses *C. gigas* (Sugumar, *et al.*, 1998) et des souches apparentées à *V. splendidus* dont *V. pectenocida*, ont également été associées à des mortalités de larves de la coquille *Pecten maximus* (Lambert, 1998; Lambert, *et al.*, 1998). De plus, *V. tubiashii*, décrit initialement comme un agent pathogène de larves de plusieurs espèces de bivalves potentiellement impliqué dans la maladie alors nommée « bacillary necrosis » (Tubiash, *et al.*, 1965), a été identifié plus tard comme l'agent causal de cette maladie (Hada, *et al.*, 1984). De nombreuses études ont porté sur cette vibriose affectant considérablement la production d'écloseries et de nurseries de bivalves (Elston et Leibovitz, 1980; Takahashi, *et al.*, 2000) ; récemment, la ré-émergence de *V. tubiashii* causant de sévères épisodes de vibrioses a été rapportée d'écloseries d'Amérique du Nord (Elston, *et al.*, 2008). Par ailleurs, chez la palourde japonaise adulte *Ruditapes philippinarum*, *V. tapetis* est décrit comme l'agent étiologique de la maladie de l'anneau brun induisant des mortalités massives depuis quelques années (Borrego, *et al.*, 1996; Allam, *et al.*, 2000; Paillard, *et al.*, 2006).

Enfin, comme il a été écrit en introduction générale, depuis une dizaine d'années, des mortalités massives (pouvant atteindre 100%) de naissains et adultes de *C. gigas* sont observées régulièrement dans le milieu naturel en période estivale. Ces mortalités estivales ne pouvant être expliquées par l'unique intervention d'un agent infectieux, la piste d'une étiologie multifactorielle,

impliquant les trois compartiments hôte, environnement et pathogène et leurs interactions, est privilégiée (Samain et McCombie, 2008). Deux types d'agents pathogènes ont été associés de façon non-systématique à ces phénomènes : un virus de type Herpès, OsHV-1 (Renault, *et al.*, 1995) et des espèces bactériennes, *V. splendidus* et *V. aestuarianus* (Waechter, *et al.*, 2002; Gay, *et al.*, 2004a; Gay, *et al.*, 2004b; Garnier, *et al.*, 2007). Même si la plupart des souches de *V. splendidus* et *V. aestuarianus* isolées dans des contextes de mortalité présentent une pathogénicité en infection expérimentale, les interactions entre huître et vibrions, leur modulation et la pathogénèse ne sont pas encore clairement documentées.

2.3 Pathogénicité et Virulence

2.3.1 La notion de virulence chez les bactéries

Evoquée en introduction, la notion de virulence rend compte de l'intensité du pouvoir pathogène d'un agent infectieux. Aujourd'hui, elle intègre de nombreux facteurs jouant sur plusieurs dimensions de temps et de lieu. Cette notion complexe ne cesse d'évoluer depuis le temps de la théorie microbienne des maladies infectieuses au milieu du XX^{ème} siècle jusqu'au développement de la Génétique et de la Biologie Moléculaire. Robert Koch (1843-1910), médecin allemand et l'un des fondateurs de la microbiologie, a formulé 4 postulats à satisfaire pour qu'un microorganisme soit considéré comme l'agent étiologique d'une maladie. Les originaux sont :

1. le micro-organisme doit être présent en abondance dans tous les organismes souffrant de la maladie, mais absent des organismes sains,
2. le micro-organisme doit pouvoir être isolé de l'organisme malade et cultivé *in vitro*,
3. le micro-organisme cultivé doit entraîner l'apparition de la maladie lorsqu'il est introduit dans un organisme sain,
4. le micro-organisme doit être à nouveau isolé du nouvel organisme hôte rendu malade puis identifié comme étant identique à l'agent infectieux original.

Ces critères, destinés à établir les relations de cause à effet entre un microorganisme et une maladie, ont d'abord été affinés par Koch lui-même, qui a abandonné la deuxième partie du postulat n°1 suite à la découverte d'individus porteurs de *V. cholerae* ne manifestant pas de symptôme ou porteurs sains, et nuancé le postulat n°3 suite à la découverte dans les cas de la tuberculose et du choléra, d'organismes exposés à l'infection mais ne développant pas la maladie.

Les études basées sur les interactions hôte/pathogène, ont remis en cause un certain nombre de définitions qui émanaient de ces postulats basés principalement sur les idées fortes que l'agent

pathogène est le seul responsable de l'expression de la maladie indépendamment de l'hôte et que cet agent pathogène est cultivable hors de l'hôte. Ainsi, initialement, l'agent pathogène était défini comme un agent microbien capable de causer une maladie, sa pathogénicité comme son aptitude à produire la maladie et sa virulence comme sa capacité à se multiplier dans l'hôte. Aujourd'hui, plusieurs révisions de cette terminologie, intégrant à la fois le rôle de l'agent pathogène, la physiologie de l'hôte, des facteurs extérieurs et les multiples interactions les reliant rendent moins restrictive cette vision (Casadevall et Pirofski, 1999). En effet, sans parler du fait qu'on estime à moins de 1% la proportion des microorganismes cultivables et des effets des conditions de culture *in vitro* sur la virulence (Casadevall et Pirofski, 1999), plusieurs microorganismes peuvent causer de même symptômes, tout comme un microorganisme peut causer plusieurs maladies, ce qui rend l'approche intégrée essentielle dans l'étude de la pathogénicité d'agents microbiens et des maladies infectieuses.

Ainsi et dans le but de lever les ambiguïtés de certaines définitions du lexique des maladies infectieuses et d'établir une classification intégrée des pathogènes, Casadevall et Pirofski (2003a) ont récemment proposé un modèle conceptuel d'approche de la pathogenèse microbienne : le « damage-response framework of microbial pathogenesis », définissant les facteurs de virulence comme « les composants d'un pathogène qui provoque des dommages chez l'hôte, ces composants incluant des éléments nécessaires à la viabilité du pathogène » (Casadevall et Pirofski, 1999, 2001, 2003b; Casadevall et Pirofski, 2009).

Tableau 3 : Les trois postulats du modèle conceptuel de « Damage-response framework » élaboré par Casadevall et Pirofski (2003a).

1.	La pathogenèse microbienne est la résultante d'une interaction entre un hôte et un microorganisme et ne peut être attribuée uniquement à l'un ou à l'autre.
2.	Le développement d'une pathologie au cours de cette interaction est déterminée par l'importance des dommages causés à l'hôte.
3.	Ces dommages peuvent résulter de facteurs microbiens et/ou de la réponse de l'hôte.

Ainsi, ce concept repose sur les trois postulats exposés ci-dessus (Tableau 3) et représente un outil d'intérêt pour la caractérisation des interactions hôte-agent pathogène. Dépassant les « microorganisms-centred views » pour la définition de la virulence, cette nouvelle approche intègre l'ensemble des interactions biologiques, de bénéfique à nuisible, du commensalisme à celle aboutissant à la mort de l'individu hôte (Figure 21).

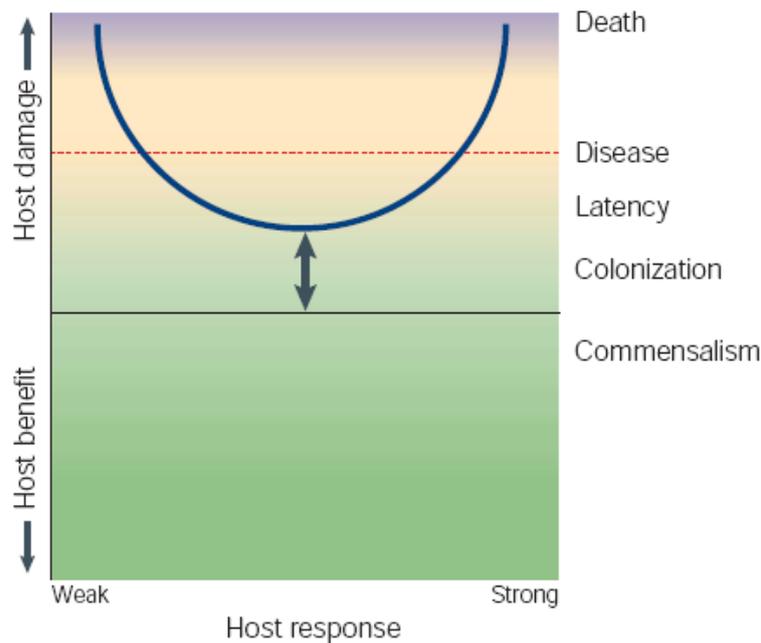


Figure 21 : Courbe de base du « Damage-response framework » décrite par Casadevall et Pirofski (2003a).

La flèche indique que la position de la courbe est variable et dépend de l'interaction hôte-pathogène considérée. L'ordonnée représente les dommages causés à l'hôte comme fonction de la réponse de l'hôte représentée en abscisse. Dans ce modèle précis, les dommages de l'hôte se produisent tout au long de la réponse de l'hôte mais sont amplifiés à chacun de ses extrêmes. La réponse de l'hôte est considérée comme un continuum, d'une réponse de faible intensité « weak » à une réponse de forte intensité « strong ». Les termes délibérément choisis pour leur imprécision, « weak » and « strong », englobent des caractéristiques qualitatives et quantitatives de la réponse de l'hôte et traduisent au mieux et sans limite, l'idée de l'existence d'une gamme de réponses potentielles. Les réponses de faible intensité « weak » sont celles qui s'avèrent insuffisantes, pauvres ou inadaptées, et qui n'entraînent aucun bénéfice à l'hôte. Les réponses de forte intensité « strong » sont celles qui sont excessives, exagérément fortes ou inadaptées, et qui peuvent induire des dommages à l'hôte. Quand un seuil de dommages est atteint, l'hôte peut présenter des symptômes, et si les dommages sont sévères, la mort de l'hôte peut s'ensuivre. Les couleurs verte, jaune et violette représentent respectivement la santé, la maladie et la maladie grave.

Par ailleurs, l'existence de souches appartenant à une même espèce et présentant des pouvoirs pathogènes différents (ex : *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*) a permis de corrélérer grâce aux récents outils de séquençage du génome, des gènes qualifiés « de virulence » à la pathogénicité observée d'un agent infectieux. Les techniques de mutagenèse permettent aujourd'hui de démontrer l'implication potentielle de gènes dans la virulence des agents pathogènes. Basés sur l'analyse moléculaire de la virulence, des nouveaux postulats ont alors été énoncés et sont destinés à établir les relations de cause à effet entre un gène potentiel de virulence et une maladie (Tableau 4).

Tableau 4 : Les postulats moléculaires de Koch (Falkow, 1988; Casadevall et Pirofski, 2003a).

1. Le phénotype, ou la propriété, étudié doit être associé aux espèces pathogènes d'un genre ou aux souches pathogènes d'une espèce.
2. L'inactivation spécifique du gène lié au trait suspecté de virulence doit mener à une atténuation mesurable de la pathogénicité ou de la virulence.
3. La réintroduction du gène « sauvage » doit conduire à la restitution de la pathogénicité.

La variabilité du contenu en facteurs de virulence de ces différents pathotypes confère donc une pathogénicité variable à l'agent pathogène. Ainsi, et d'un point de vue centré sur le pathogène, de nombreux facteurs de virulence ont été identifiés et sont généralement classés en deux types :

1. les premiers qualifiés de « majeurs » sont indispensables au caractère hautement pathogène d'un isolat bactérien : on peut citer en exemple la toxine CT (Cholera Toxin) des souches de *V. cholerae* des sérogroupes O1, du CPS (Capsular PolySaccharides), du LPS (LipoPolySaccharide) et de l'hémolysine/cytolysine de *V. vulnificus* ou encore de la TDH (Thermostable Direct Hemolysin) et du TTSS (Type III Secretion System) de *V. parahaemolyticus*.
2. les deuxièmes qualifiés « d'accessoires » ou « secondaires » peuvent être variables d'une souche à l'autre et conférer un degré plus ou moins élevé de virulence : on peut citer les exemples des toxines RTX (Repeat in Toxin) et cytolysine/hémolysine et du pilus MSHA (Mannose-Sensitive Hemagglutinin) de *V. cholerae*, ou encore du flagelle et du sidérophore vulnibactine chez *V. vulnificus*.

Différentes études ont ainsi montré que la délétion de gènes considérés comme codant des effecteurs majeurs de la virulence pouvait tout de même s'accompagner de symptômes résiduels classiquement associés à la maladie et attribuables à d'autres effecteurs « accessoires » de la virulence (Kaper, *et al.*, 1984; Tacket, *et al.*, 1993; Taylor, *et al.*, 1994; Coster, *et al.*, 1995). Le paragraphe ci-après (cf. paragraphe 2.3.3) présente les principaux facteurs de virulence décrits à ce jour, principalement chez les *Vibrio* faisant l'objet des recherches les plus nombreuses, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*.

2.3.2 Plasticité génomique

Enfin, ces définitions, même si elles ont le mérite de clarifier les idées, ne sont que trop figées et simplistes aux vues des capacités des génomes, et plus particulièrement des génomes bactériens, à se modifier au cours du temps et en fonction des conditions de l'environnement. Cette plasticité génomique est non seulement source d'adaptabilité mais également à la base de l'évolution des bactéries pathogènes (Figure 22) (Pallen et Wren, 2007).

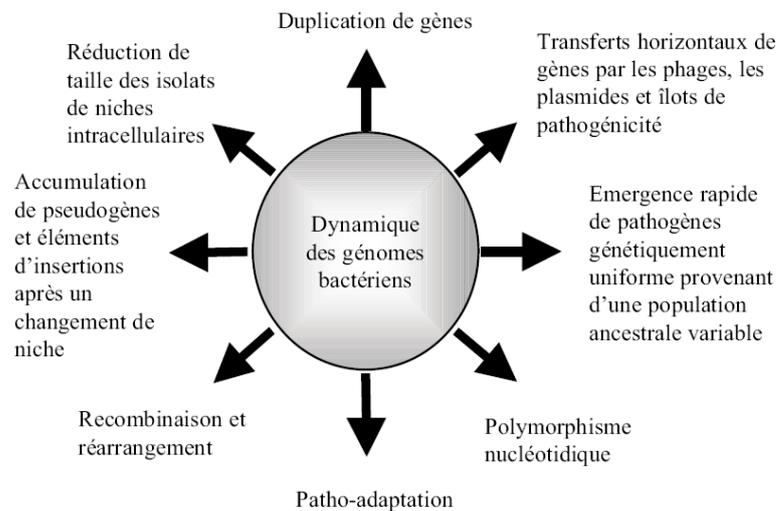


Figure 22 : Dynamique des génomes bactériens (Pallen et Wren, 2007).

Sans rentrer dans le détail des mécanismes d'évolution du génome, ni évoquer les phénomènes de transmissions verticales des modifications du génome *via* des processus de mutations ponctuelles ou de recombinaisons, les bactéries ont la capacité d'acquérir (et de perdre) de l'ADN exogène par le biais de trois grands mécanismes de transferts horizontaux de gènes (HGT) qui sont 1. la transformation (transfert génétique d'ADN libre et nu de l'environnement), 2. la transduction (infection par un bactériophage) et 3. la conjugaison (transfert d'ADN sous la forme plasmidique d'une bactérie à l'autre par le biais d'un pilus). Ces trois mécanismes font intervenir des éléments génétiques mobiles, comme des phages, plasmides et transposons (Figure 23).

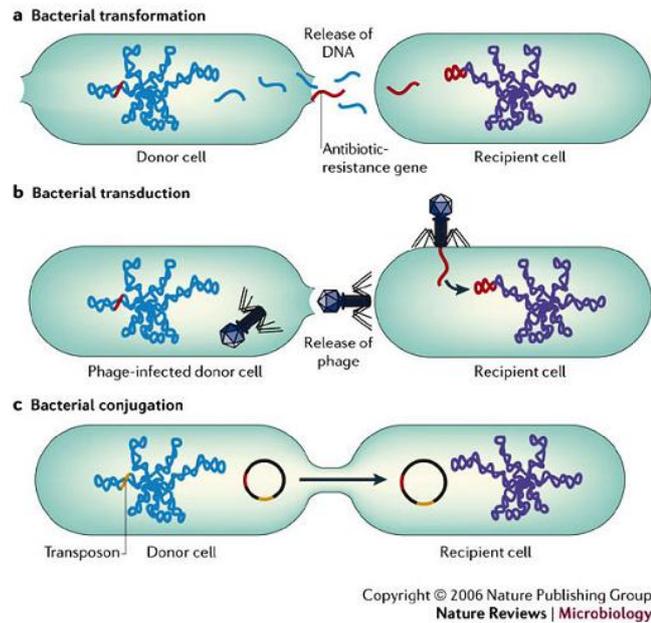


Figure 23 : Les trois grands mécanismes de transferts horizontaux de gènes chez les bactéries (Furuya et Lowy, 2006).

De nombreuses études portent sur ces mécanismes de transferts horizontaux qui apparaissent très répandus chez les *Vibrionaceae* (Garcia-Vallve, *et al.*, 2003; Nakamura, *et al.*, 2004). Ces acquisitions de gènes ou groupes de gènes confèrent des avantages adaptatifs variés, comme une résistance à un stress antibiotique (Davies, 1996), l'acquisition de gènes codant des protéines mieux adaptées à un nouvel environnement, une nouvelle voie métabolique permettant l'adaptation à une nouvelle niche écologique ou encore une virulence et ses déterminants.

Ces mécanismes de transferts horizontaux, qui peuvent être observés à l'échelle interspécifique, peuvent donc générer de profondes modifications phénotypiques et ce sur une très courte échelle de temps. Non seulement ils peuvent expliquer pour partie la variabilité extraordinaire des propriétés métaboliques et des caractéristiques phénotypiques des bactéries, mais aussi ils rendent compte d'un réel dynamisme du génome bactérien et apparaissent donc comme un puissant moteur de l'évolution (Lan et Reeves, 1996; Doolittle, 1999). Par ce biais, de nouveaux pathogènes peuvent émerger ou la virulence d'un agent déjà pathogène peut s'accroître considérablement. La définition de la virulence n'apparaît donc plus limitée à la caractéristique d'un agent pathogène mais devient un phénomène complexe (au sens de délicat à décrire, car composé de nombreux éléments interagissant entre eux de manière parfois non déterministe), dynamique et changeant, dépendant des facteurs de l'agent pathogène, de la sensibilité de l'hôte et de la nature de leurs interactions (Casadevall et Pirofski, 2003b).

2.3.3 Les mécanismes de virulence des *Vibrio*

Qu'ils soient majeurs ou accessoires, qu'ils présentent des rôles directs ou indirects dans la pathogenèse, de nombreux facteurs de virulence bactériens ont été décrits et leur classification en catégorie fonctionnelle peut paraître réductrice compte tenu de la complexité dynamique des combinaisons et interactions qui conduisent au développement d'une infection et à l'expression d'une maladie (Finlay et Falkow, 1997). L'implication des facteurs de virulence des pathogènes opportunistes dans les processus d'infection est particulièrement difficile à caractériser puisqu'elle est intimement dépendante de l'état immuno-physiologique de l'individu-hôte infecté qui détermine sa sensibilité à l'agent infectieux. Tous participent à différentes étapes de l'infection bactérienne, de la colonisation des surfaces de l'hôte à la pénétration dans l'hôte, de l'invasion et la colonisation dans l'environnement de l'hôte, de l'inhibition ou la perturbation du système immunitaire de l'hôte, de l'échappement à ce système immunitaire et enfin de la perturbation ou la destruction des fonctions essentielles de l'hôte. Il est cependant clairement établi que certaines catégories fonctionnelles des facteurs de virulence sont chevauchantes et que certains déterminants peuvent être attribués à plus d'un groupe (Casadevall et Pirofski, 2009). Néanmoins et dans un souci de synthèse, on peut distinguer arbitrairement trois types de facteurs de virulence produits par les bactéries: 1. les facteurs de colonisation et d'invasion de l'hôte, 2. les facteurs capables de perturber, d'altérer ou de détruire des fonctions essentielles de l'hôte et 3. les facteurs d'échappement au système immunitaire de l'hôte. Ces facteurs de virulence ont été plus particulièrement identifiés chez les *Vibrio* pathogènes pour l'homme précédemment évoqués et dont les génomes ont été entièrement séquencés, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* (Heidelberg, *et al.*, 2000; Chen, *et al.*, 2003; Makino, *et al.*, 2003) mais également chez *V. anguillarum*, *V. harveyi* ou d'autres espèces pathogènes de poissons, de crustacés et de mollusques (Austin, 2010) : ces exemples serviront dans les paragraphes suivants à illustrer les différentes catégories des facteurs de virulence.

2.3.3.1 Les facteurs de colonisation et d'invasion de l'hôte

Le flagelle

La mobilité est une caractéristique commune aux organismes pathogènes, intimement associée à la virulence de ces derniers, et leur conférant un avantage adaptatif évident. En effet, elle leur attribue une capacité de migration vers des niches écologiques préférentielles tels que certains tissus de l'hôte, de mise en contact avec les cellules de l'hôte et de pénétration des membranes cellulaires,

d'échappement aux substances toxiques et enfin de fuite du compartiment intracellulaire et de dispersion dans l'environnement pendant la transmission. La plupart des cellules bactériennes et notamment de *Vibrionaceae* sont mobiles grâce à l'action d'organites spécialisés, les flagelles (Figure 24).

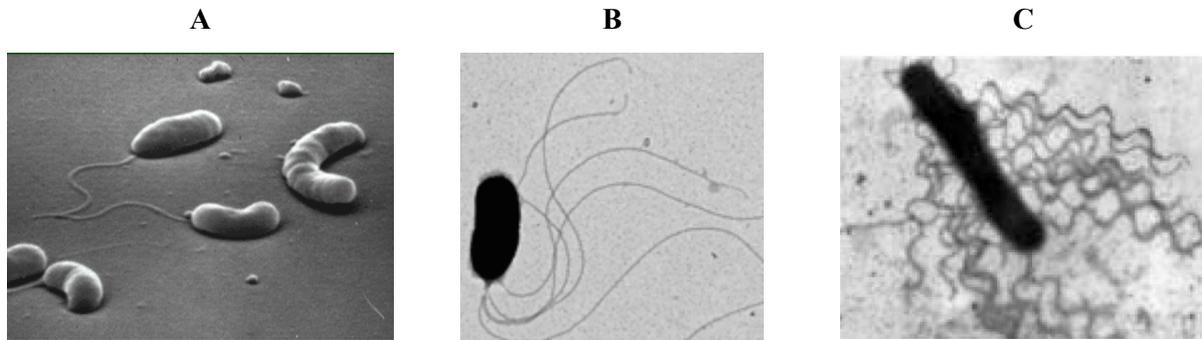


Figure 24 : A. Flagelle polaire unique chez *V. cholerae* (MEB), B. Flagelles multiples chez *V. fisheri* (MET) et C. Flagelles latéraux multiples chez *V. parahaemolyticus* (MET).

Ce flagelle est une structure ancrée dans la membrane plasmique, semi-rigide et rotative, actionnée par un moteur moléculaire qui entraîne un filament agissant comme une hélice. La capacité des bactéries à moduler le sens de rotation du flagelle permet une propulsion orientée de la cellule procaryote vers des substances attractives (O'Toole, *et al.*, 1999) ou à l'opposé de substances répulsives (Parkinson, *et al.*, 2005) : ce mouvement dirigé (non-aléatoire) est appelé chimiotactisme. L'ultrastructure du flagelle bactérien de *Vibrio*, décrit notamment par Yorimitsu et Homma (2001) (Figure 25), est composée de 3 parties principales : 1. le filament flagellaire, cylindre creux et rigide constitué de l'empilement de monomères d'une seule protéine, la flagelline, 2. le crochet constitué de différentes sous-unités protéiques et transmettant le mouvement provenant du 3. corps basal, de structure plus complexe, composé de 4 anneaux (L, P, S et M) et ancré dans la membrane bactérienne.

Deux types de mobilité sont observés chez les *Vibrio* : 1. la mobilité de type « swimming » assurée par un seul flagelle polaire et adaptée à des environnements aqueux de faible densité comme l'eau de mer et 2. la mobilité de type « swarming » assurée par des flagelles latéraux et adaptée à des environnements visqueux comme le mucus retrouvé au niveau de l'épithélium de certains hôtes (McCarter, 2001). Si les *Vibrio* possèdent le plus souvent un flagelle polaire unique, des flagelles latéraux ont été décrits chez *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* et *V. harveyi* (Yorimitsu et Homma, 2001).

Le mouvement du flagelle est assuré par un couplage osmo-mécanique, à partir d'un gradient électrochimique qui permet le passage d'ions Na^+ (concernant la plupart des flagelles polaires) ou H^+

(concernant plus généralement les flagelles latéraux) au travers de la membrane et qui fournit l'énergie osmotique convertie en énergie mécanique.

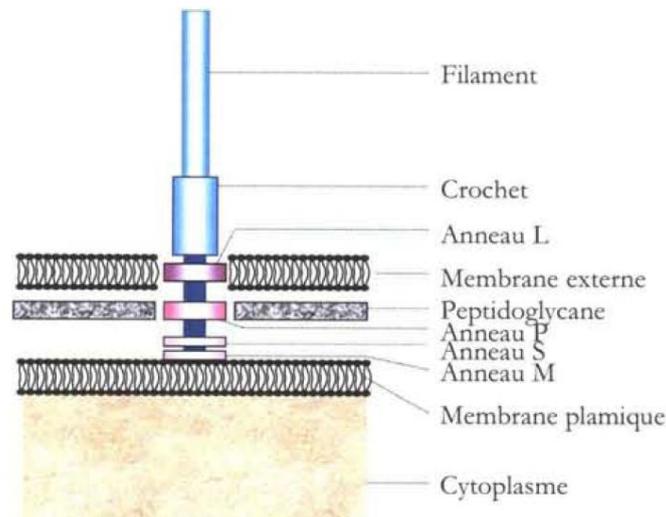


Figure 25 : Ultrastructure du flagelle bactérien de bactérie Gram négatif (Yorimitsu et Homma, 2001).

La mobilité bactérienne est un processus complexe qui nécessite une forte dépense en énergie, pouvant constituer une part importante du métabolisme de la cellule (2% de l'énergie totale chez *Escherichia coli*). Il est dépendant d'une cinquantaine de gènes régulés par de nombreux mécanismes de contrôle et dont la mutation résulte le plus souvent en une atténuation de la virulence (Lee, *et al.*, 2004a). En effet, chez *V. vulnificus*, la création de mutants présentant des délétions au niveau des gènes *flgC* et *flgE* codant le flagelle a permis de démontrer son rôle dans le processus de mortalité chez la souris et dans l'attachement du pathogène au niveau des cellules épithéliales humaines (Ran Kim et Haeng Rhee, 2003). De la même façon, l'implication du flagelle dans la pathogénicité a également été démontrée chez *V. anguillarum* par des techniques de mutagenèse dirigée (Milton, *et al.*, 1996) : des mutants non mobiles générés par transposition et testés pour leur virulence *in vivo* ne présentaient plus de virulence par balnéation (O'Toole, *et al.*, 1996). Enfin, le flagelle semble constituer chez les *Vibrio* un facteur de virulence de type accessoire, dont le rôle reste parfois difficile à démontrer compte tenu des phénomènes de « compensation de virulence » observés chez certains mutants dépourvus de flagelle chez *V. cholerae* (Gardel et Mekalanos, 1996).

Les pili

La première étape du processus de colonisation repose sur l'adhérence à une cellule cible de l'hôte. De nombreuses bactéries Gram négatif possèdent des appendices de surface plus courts et plus fins que le flagelle, appelés pili dont on peut distinguer deux types : les pili communs et les pili

sexuels. Ces pili arbitrent les interactions entre les bactéries entre elles, l'hôte et l'environnement. Alors que les pili sexuels participent à la conjugaison et permet l'échange de matériel génétique entre deux bactéries, les pili communs, plus nombreux, permettent la fixation des bactéries sur les surfaces de l'hôte, conditionnant ainsi leur pouvoir pathogène. Disposés régulièrement à la surface de la bactérie, les pilis communs sont des structures protéiques filamenteuses constituées par la polymérisation d'une même sous-unité protéique, la piline, assemblée à des polypeptides mineurs comme l'adhésine. L'adhésine peut interagir avec des récepteurs, de type glycoprotéine ou glycolipide, présents à la surface des cellules hôtes.

Le pili de type IV a été largement décrit comme étant impliqué dans l'adhérence, la formation de biofilms et dans la mobilité (Bardy, *et al.*, 2003). Par ailleurs, trois différents types de pili ont été identifiés chez *V. cholerae* et associés à la pathogénicité des sérogroupes. Le Toxin-Coregulated Pilus (TCP) (Kovach, *et al.*, 1996; Karaolis, *et al.*, 1998; Heidelberg, *et al.*, 2000) est un facteur de virulence majeur dans le processus infectieux de *V. cholerae* : indispensable à la colonisation du tractus intestinal de l'homme (Figure 26) (Tacket, *et al.*, 1998), le TCP sert également de récepteur au bactériophage filamenteux CTX Φ dont le génome code entre autre la toxine cholérique. Quinze gènes regroupés sur un îlot de pathogénicité appelé VPI (39.5kpb) et caractéristique des souches de *V. cholerae* à l'origine d'épidémies et de pandémies, contrôlent la biosynthèse de ce pilus. Le pilus mannose-sensitive hemagglutinin (MSHA) semble jouer également un rôle, bien que mineur, dans la virulence (Osek, *et al.*, 1992; Attridge, *et al.*, 1996). D'autres gènes codant des facteurs d'adhésion ont été décrits, les *cep* (Core-encoded pili), *acf* (accessory colonisation factor) et *ompU* (outer membrane protein) (Pearson 1993, Sperandio 1995). De même, l'implication du pilus dans la pathogénicité de *V. vulnificus* a été démontrée par mutation des gènes *pilD* et *pilA* induisant notamment une diminution de l'adhérence aux cellules épithéliales (Paranjpye, *et al.*, 1998; Paranjpye et Strom, 2005).

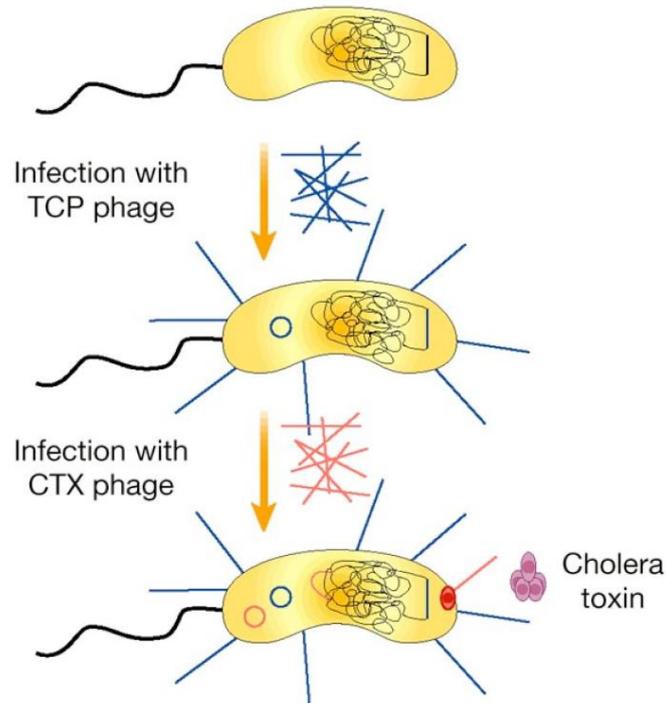


Figure 26 : Description du rôle du TCP (Toxin corregulated pilus) de *V. cholerae*, un exemple de pilus de type IV (Donnenberg, 2000).

Le phage TCP infecte *V. cholerae* et sert ensuite de point de fixation du phage CTX Φ nécessaire à son entrée dans la bactérie. *V. cholerae* doit donc être dans un premier temps infecté par le phage TCP pour ensuite être infecté par le phage CTX Φ .

Les enzymes hydrolytiques

Outre sa capacité à coloniser et à adhérer aux surfaces de l'hôte, le pouvoir pathogène d'une bactérie tient également à son aptitude à envahir son hôte. Pour cela, de nombreuses bactéries pathogènes excrètent différentes protéines extracellulaires regroupées sous le terme d'invasines. Ces enzymes hydrolytiques présentent différentes fonctions facilitant l'approvisionnement de la bactérie en ressource carbonée et azotée, la dégradation de la matrice extracellulaire et donc de l'organisation tissulaire au moment de l'invasion, mais aussi modulant les réactions de défense de l'hôte et les mécanismes d'échappement. Le terme générique d'invasines regroupe classiquement les enzymes agissant à faible distance du siège de la multiplication cellulaire et ne provoquant pas la lyse cellulaire, les distinguant alors de certaines toxines extracellulaires.

Depuis une trentaine d'années, une grande variété d'enzymes hydrolytiques a été décrite chez de nombreuses espèces de *Vibrio*, incluant notamment des protéases, des lipases, des nucléases et des hyaluronidases et souvent associée à la virulence des agents pathogènes. Les métalloprotéases sont des enzymes protéolytiques dont l'activité catalytique nécessite un ion métallique. Il s'agit d'endo- ou

d'exopeptidases, zinc-dépendantes pour la plupart, qui clivent des peptides ou des protéines de façon plus ou moins spécifique.

Chez *V. cholerae*, la métalloprotéase HA/protéase active la sous-unité de l'entérotoxine cholérique et dégrade également la mucine intestinale facilitant l'action de la toxine cholérique (Booth, *et al.*, 1984; Crowther, *et al.*, 1987; Hase et Finkelstein, 1991). Chez *V. vulnificus*, la dégradation du collagène de type IV par la métalloprotéase EmpV est directement associée à une destruction des tissus, des nécroses de la peau mais également à des réactions hémorragiques (Chuang, *et al.*, 1997; Miyoshi, *et al.*, 1998). Le rôle de la métalloprotéase EmpA chez *V. anguillarum*, dont l'expression est induite par le mucus intestinal chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*, a été étudié en détail (Denkin et Nelson, 1999; Denkin et Nelson, 2004) : un mutant de délétion du gène *empA* n'est plus virulent en balnéation alors qu'il garde sa virulence en injection. De plus, il a été montré récemment l'action cytolytique de la protéine EmpA purifiée sur un lignée cellulaire de poisson (Yang, *et al.*, 2007). Une métalloprotéase zinc-dépendante a également été isolée et caractérisée chez *V. tubiashii* (Delston, *et al.*, 2003).

Enfin, la métalloprotéase InhA produite par *Bacillus thuringiensis*, bactérie insecticide la plus utilisée au monde dans l'agriculture biologique, permet la résistance de cet agent pathogène face aux attaques du système immunitaire de l'insecte hôte en dégradant de façon assez sélective les peptides antimicrobiens (Dalhammar et Steiner, 1984). Il est également intéressant de noter que les neurotoxines botulique et tétanique, produites par des bactéries du genre *Clostridium*, sont douées d'une activité enzymatique de type métalloprotéasique, indispensable aux réactions aboutissant à l'inhibition de la libération de neuro-transmetteurs, entraînant la mort par paralysie progressive flasque dans le botulisme et spastique dans le tétanos (Ménez, *et al.*, 2006; Rossetto, *et al.*, 2006).

Pour conclure, les métalloprotéases décrites chez les bactéries sont des enzymes aux fonctions multiples impliquées dans les processus de multiplication et de survie de la bactérie dans l'hôte mais également dans les mécanismes d'invasion et de destruction tissulaire, d'échappement au système de défense et de modulation de ce système au cours d'une infection et des processus d'inflammation (Figure 27) (Travis, *et al.*, 1995; Maeda et Yamamoto, 1996). Dans l'hôte, il est probable que ces métalloprotéases bactériennes rentrent en interaction avec les inhibiteurs de métalloprotéinases, les TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase), pouvant notamment limiter ou maîtriser les processus infectieux, réduire le taux de croissance de l'agent pathogène et rétablir un système de défense efficace (cf. paragraphe 1.4.2.2).

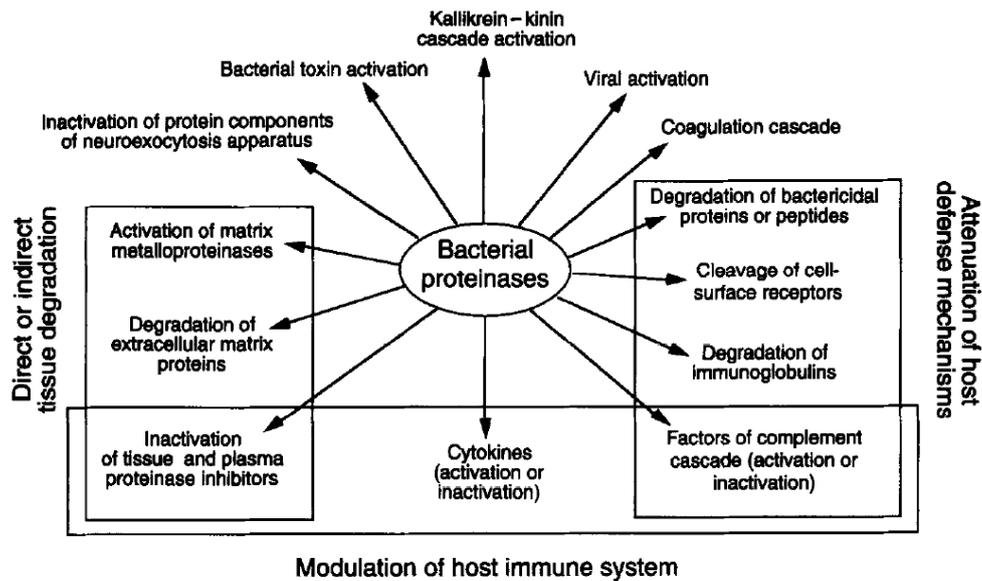


Figure 27 : Les multiples fonctions des protéases bactériennes dans le processus d'infection (Travis, *et al.*, 1995).

Les sidérophores

Il ne fait nul doute que, pour survivre et se multiplier dans l'hôte, les bactéries doivent développer des mécanismes d'approvisionnement en nutriments nécessaires à leur croissance. Le fer en est un élément essentiel et intervient dans de nombreux processus biologiques (régulation de gène ou certaines réactions enzymatiques). Il a été estimé qu'une suspension bactérienne de *E. coli* de l'ordre de 10^9 cellules/mL consommait jusqu'à 10^{18} atomes de fer par litre. Du fait de la solubilité réduite du fer (environ $6 \cdot 10^6$ atomes par litre) et de sa présence sous forme libre limitée à de très faible quantité dans l'environnement, les bactéries ont donc développé des systèmes optimisés d'acquisition du fer : le plus connu est le sidérophore (Figure 28). Ces petites molécules de très faible poids moléculaire (<1000 Da) chélatent le fer soluble Fe^{3+} dans l'environnement avec une très haute affinité et peuvent aussi l'extraire de protéines porteuses de l'organisme-hôte, comme la transferrine présente chez les mammifères. Chez les bactéries Gram négatif, les sidérophores chélatés au fer sont internalisés à travers la membrane externe par le biais d'un système multiprotéique transmembranaire complexe qui permet la mise à disposition du fer pour la bactérie (Andrews, *et al.*, 2003). Plus de 500 sidérophores ont été décrits et classés en trois groupes en fonction de la structure chimique du groupe fonctionnel se liant au fer (Crosa, 1997).

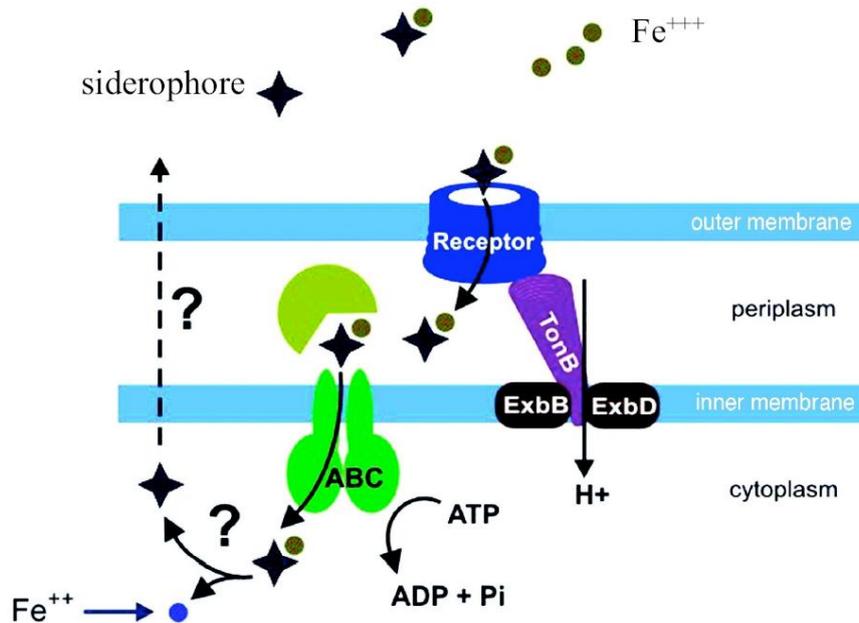


Figure 28 : Mécanismes d'acquisition du fer par les sidérophores chez les bactéries Gram négatif (Wandersman et Delepelaire, 2004; Binesse, 2008).

L'ion Fe^{3+} , chélaté au sidérophore, est reconnu puis transporté à travers la membrane externe par un récepteur spécifique. Ce transport requiert une membrane cytoplasmique énergisée et un « transducteur d'énergie » (le complexe TonB-ExbBExbD). Des protéines de liaison permettent ensuite le transport du ferrisidérophore à travers le périplasm vers des perméases et des transporteurs de type ABC (ATP binding cassette), responsables de l'entrée du complexe dans le cytoplasme où il se dissocie soit par digestion partielle, soit par un processus réductif et libère l'ion Fe^{2+} .

De nombreuses espèces de *Vibrio* produisent des sidérophores, comme *V. parahaemolyticus* (Yamamoto, *et al.*, 1994) ou *V. cholerae* (Griffiths, *et al.*, 1984). Chez *V. vulnificus*, un sidérophore particulier a été mis en évidence, la vulnibactine (Okujo, *et al.*, 1994). Son rôle dans la virulence a été démontré par l'atténuation du phénotype pathogène chez des mutants ne synthétisant plus la vulnibactine et ne pouvant plus extraire de fer à partir de la transferrine (Litwin, *et al.*, 1996). Chez *V. anguillarum*, le sidérophore, nommé l'anguibactine et codé par un opéron localisé sur le plasmide pJM1, constitue un facteur de virulence majeur (Crosa, *et al.*, 1977; Crosa, 1980; Actis, *et al.*, 1986; Crosa, 1997). Ce même opéron code le complexe protéique de transport (Complexe FatABCD) permettant l'internalisation de l'anguibactine dans le cytoplasme de la bactérie (Actis, *et al.*, 1995; Stork, *et al.*, 2002; Stork, *et al.*, 2004; López et Crosa, 2007) dont l'implication dans la pathogénicité a été démontrée avec détails (Crosa, 1997). Enfin, il a été observé des phénomènes de compétition entre différents microorganismes pour le captage de sidérophores : certaines bactéries, comme *V. anguillarum*, sont capables d'intercepter les sidérophores d'autres bactéries, comme l'acinétobactine de *Acinetobacter baumannii* afin d'occuper de façon dominante une niche écologique (Dorsey, *et al.*, 2004).

2.3.3.2 Les facteurs capables d'altérer l'hôte : les toxines

En provoquant soit des lésions, soit des dysfonctionnements cellulaires, les facteurs capables d'altérer l'hôte sont principalement composés de toxines. Il existe une grande variété de structure des toxines et une grande diversité dans leurs effets pathologiques rendant les possibilités de classification multiples (Ménez, *et al.*, 2006). On peut cependant distinguer les exotoxines excrétées ou libérées dans le milieu, des endotoxines qui font partie intégrante des corps microbiens.

Les exotoxines

Les exotoxines sont des protéines bactériennes toxiques excrétées dans le milieu extracellulaire ou libérées après lyse de la bactérie et présentant une activité biologique le plus souvent catalytique et une forte spécificité d'action. Elles sont généralement thermolabiles et sensibles aux agents dénaturants. On distingue classiquement trois types d'exotoxines qui diffèrent selon leur structure et leur mode d'action.

- Les **toxines de type AB** sont composées de deux modules : l'un se fixe au niveau du récepteur de la cellule hôte et détermine une spécificité d'action et l'autre porte le site catalytique siège de la toxicité. Chez *V. cholerae*, le module B de la toxine CT (Cholera Toxin) se fixe sur un récepteur spécifique, le GM1 ganglioside présent à la surface des entérocytes, et le module A catalyse l'ADP-ribosylation de la protéine G_{sα} qui active l'adénylate cyclase de façon permanente et non-contrôlée au niveau du cytoplasme de la cellule eucaryote ciblée (Figure 29). L'augmentation d'AMPc intracellulaire conséquente induit une perte de contrôle du flux ionique et conduit à la perte passive d'eau par les cellules, principal symptôme du choléra.

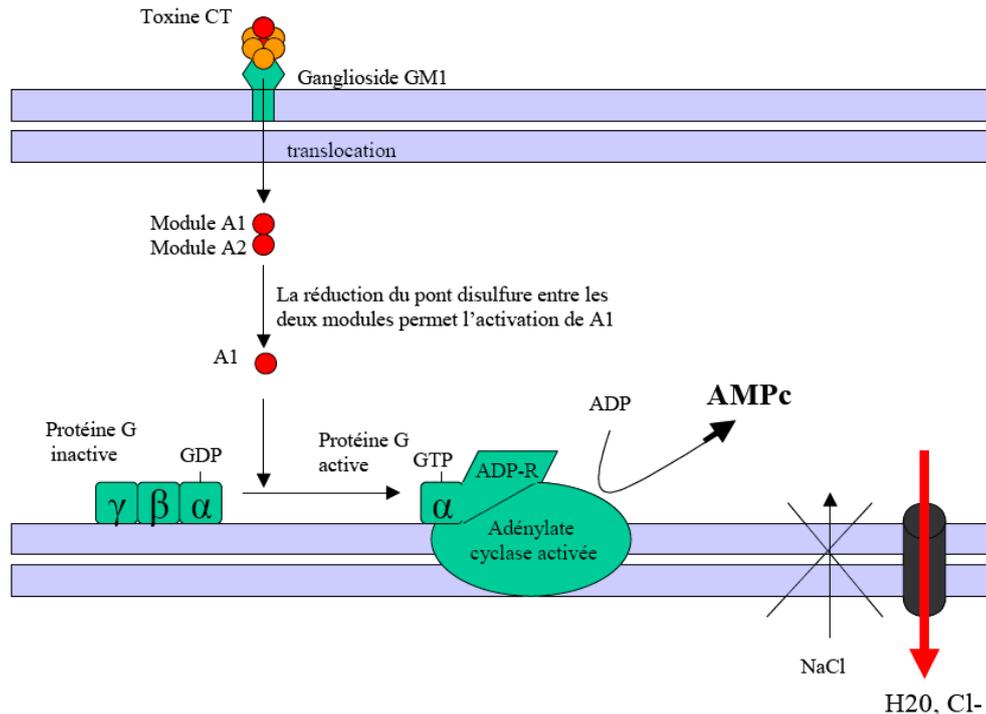


Figure 29 : Mode d'action de la toxine cholérique CT (Reynaud, 2008).

Après fixation au récepteur GM1, la sous-unité A est transloquée dans le cytosol où elle est activée par réduction thiol-dépendante. La sous-unité ainsi tronquée, A1, catalyse l'ADP-ribosylation d'une protéine G. L'activation de l'adénylate cyclase conduit à la libération d'AMPc, messenger intracellulaire ubiquiste. L'AMPc inhibe l'absorption active de NaCl et augmente la sécrétion d'eau et d'ions chlorures.

- Les **toxines lytiques**, parmi lesquelles les hémolysines sont très répandues chez les vibrions pathogènes (Zhang et Austin, 2005), provoquent la lyse de différents types cellulaires de vertébrés, érythrocytes ou cellules du système immunitaire, leur conférant le nom plus générique de cytolysine (Shinoda, 1999). Leur action est caractérisée par la formation de pores au niveau de la membrane plasmique des cellules eucaryotes cibles, induisant la lyse cellulaire et le relargage des protéines transportant le fer (comme l'hémoglobine, la transferrine ou la lactoferrine), des lésions tissulaires ou encore la destruction des cellules du système immunitaire de l'hôte. Quatre représentants de familles d'hémolysines sont décrits chez les vibrions : TDH (Thermostable Direct Hemolysine) de *V. parahaemolyticus*, HlyA de *V. cholerae* O1 El Tor, TLH (ThermoLabil Hemolysin) et δ -VPH (*Vibrio parahaemolyticus* hemolysin) de *V. parahaemolyticus* (Zhang et Austin, 2005). Certaines de ces hémolysines ont pu être associées à la virulence, comme la TDH de *V. parahaemolyticus* (Takeda, 1988). Par ailleurs, les toxines RTX (Repeats in Toxin) induisent également la lyse cellulaire par la formation de pores membranaires. Un gène codant pour une protéine de cette famille a été identifié chez *V. cholerae* (Lin, *et al.*, 1999; Fullner et Mekalanos, 2000; Heidelberg, *et al.*, 2000). La production de RTX est associée chez *V. cholerae* O1 El Tor et O139 à un effet

cytopathogène lié à un arrondissement des cellules épithéliales humaines par dépolymérisation des filaments d'actine du cytosquelette (Fullner et Mekalanos, 2000). Enfin, les phospholipases, à activité également cytolytique, coupent le groupement phosphate chargé des phospholipides et déstabilisent ainsi la bicouche lipidique. Différentes phospholipases ont été décrites chez de nombreux vibrions pathogènes, comme chez *V. vulnificus* (Lee, *et al.*, 2004b) et *V. harveyi* (Sun, *et al.*, 2007).

- Les **toxines injectées** : certaines toxines protéiques et cytotoxiques sont injectées directement dans les cellules hôtes par le biais de systèmes de sécrétion complexes. Provoquant une perturbation des processus cellulaires et une lyse des cellules de défense, l'action de ces toxines permet un échappement au système immunitaire de l'hôte. Le système de sécrétion de type III (ou SSTT), un des plus complexes décrit à ce jour et nécessitant l'expression de plus de 20 gènes (Winstanley et Hart, 2001; Mota, *et al.*, 2005), permet la sécrétion et la translocation de facteurs de virulence dans le cytosol des cellules eucaryotes cibles (Figure 30) (Hueck, 1998; Kubori, *et al.*, 1998; Tamano, *et al.*, 2000; Blocker, *et al.*, 2001; Daniell, *et al.*, 2001; Sekiya, *et al.*, 2001). Ce système de sécrétion est commun à de nombreuses bactéries Gram négatif, comme les espèces *Yersinia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp. ainsi que les *E. coli* entéropathogènes et entérohémorragiques. Le séquençage complet d'une souche de *V. parahaemolyticus* a permis de mettre en évidence deux opérons codant deux TTSS : l'un, le SSTT1, est impliqué *in vitro* dans la cytotoxicité alors que l'autre, le SSTT2 retrouvé dans les souches pathogènes pour l'homme, est responsable d'une activité entérotoxique induisant une accumulation de fluide intestinal. Des opérons codant des SSTT ont été identifiés chez diverses souches de *Vibrio* comme *V. cholerae* et *V. harveyi* (Henke et Bassler, 2004a; Dziejman, *et al.*, 2005), tandis que des gènes homologues au SSTT ont été mis en évidence chez *V. alginolyticus* et *V. tubiashii* (Park, *et al.*, 2004). Enfin, un nouveau système de sécrétion de type IV a été décrit chez *V. cholerae* et serait responsable de la défense de *V. cholerae* contre des prédateurs eucaryotes comme l'amibe *Dictyostelium discoideum* (Pukatzki, *et al.*, 2006).

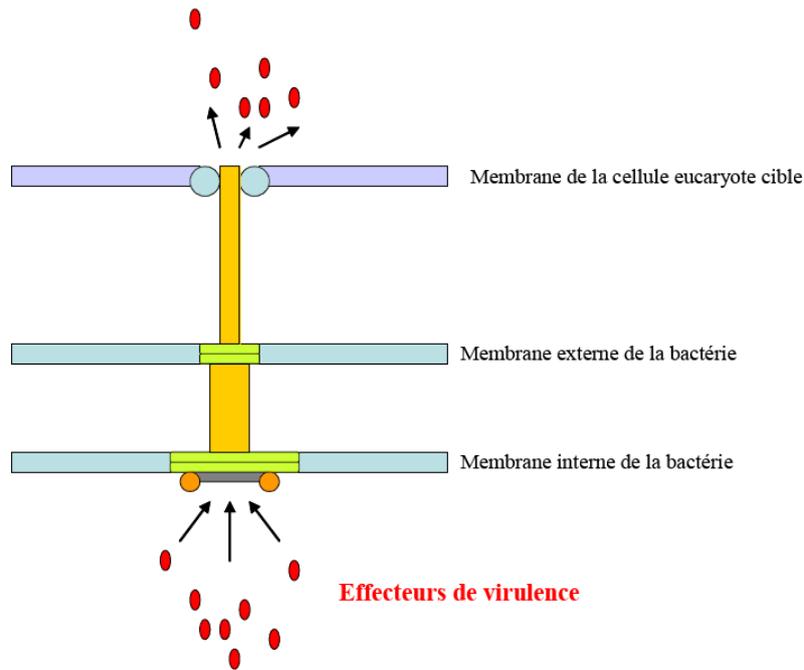


Figure 30 : Représentation schématique du système de sécrétion de type III (SSTT) (Hueck, 1998; Reynaud, 2008).

Les endotoxines

Les endotoxines regroupent les composés toxiques structuraux de la paroi des bactéries Gram négatif, appelés lipopolysaccharides ou LPS. Composant de la membrane externe, le LPS est constitué de trois parties : 1. le lipide A est responsable de la toxicité du LPS et de ses capacités immunomodulatrices, 2. le polysaccharide central ou « core » maintient la membrane externe et 3. la chaîne latérale O hydrophile est exposée au milieu extérieur et présente une grande variabilité à l'origine de la spécificité sérologique (Figure 31) (Reidl et Klose, 2002; Caroff et Karibian, 2003). Le LPS devient toxique après la lyse cellulaire de la bactérie provoquée par la réponse immunitaire de l'hôte ou par un traitement antibiotique. Ce choc endotoxique induit par la libération massive des LPS, entraîne leur relargage dans le système circulatoire, où ils se fixent à une protéine de type LBP (LPS binding protein) (cf. paragraphe 1.4.1.1). Le complexe LPS/LBP, reconnu par différents récepteurs présents à la surface des macrophages (de la famille des Toll), provoque l'activation du facteur de transcription NF- κ B (nuclear factor κ B) qui induit une production massive de cytokines proinflammatoires. La toxicité des LPS repose donc sur leur capacité à induire l'apoptose de la cellule hôte (Foster, *et al.*, 2000) mais également, une sur-stimulation du système immunitaire donnant lieu à un choc septique, caractérisé par des symptômes tels que oedèmes tissulaires, fièvre, hémorragies et hypotension (comme décrit chez *V. vulnificus*) (Linkous et Oliver, 1999). Chez *V. cholerae*, d'autres

composés structuraux, les porines OmpU et OmpT ont été associés à la virulence (Nesper, *et al.*, 2001; Mathur, *et al.*, 2007).

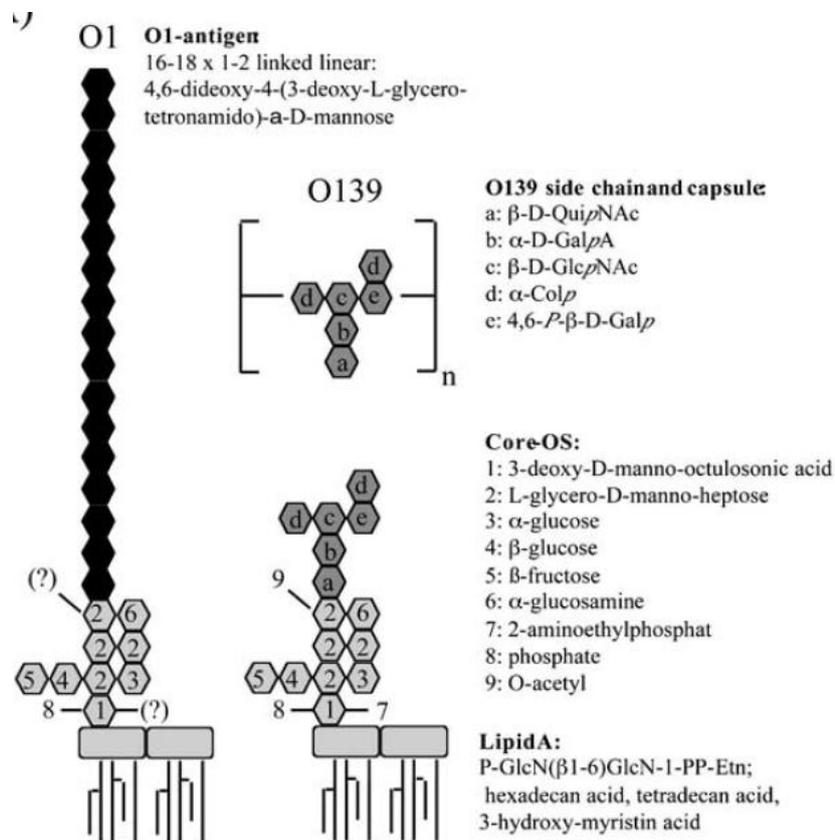


Figure 31 : Structure des LPS et de la capsule des sérogroupes O1 et O139 de *V. cholerae*.

Le lipide A et le core sont identiques pour les deux sérogroupes. Les quelques différences chimiques sont indiquées par « ? » (Reidl et Klose, 2002).

Il a pu être montré récemment que les LPS, tout comme les protéines de capsule et les OMP (Outer Membrane Protein) interagissent avec le système immunitaire inné de l'hôte au travers de motifs conservés désignés sous le terme générique de MAMPs pour "microbe-associated molecular patterns", ou PAMPs pour "pathogen-associated molecular patterns". En effet les MAMPs ou PAMPs sont reconnus par les PRRs ou "Pattern recognition receptors" de l'hôte et ces interactions conduisent à l'activation des mécanismes de défenses de celui-ci (Medzhitov, 2007). Ainsi de nombreuses études visant l'étude de la modulation de la réponse immunitaire innée de l'hôte ont permis de les mettre en évidence et de les classifier d'un point de vue moléculaire ; ces MAMPs ou PAMPs sont également utilisés par injection expérimentale dans l'hôte en tant qu'inducteurs potentiels des réactions de défenses (Aladaileh, *et al.*, 2007; Costa, *et al.*, 2009; Green et Barnes, 2009; Nyholm, *et al.*, 2009; Vance, *et al.*, 2009).

2.3.3.3 Les facteurs d'échappement au système immunitaire de l'hôte

Même si les invertébrés comme *Caenorhabditis elegans* (Kurz et Ewbank, 2003; Gravato-Nobre et Hodgkin, 2005), *Drosophila melanogaster* (Tzou, *et al.*, 2002; Vodovar, *et al.*, 2004) ou *Manduca sexta* (Silva, *et al.*, 2002) restent les modèles d'interactions bactéries-hémocytes les plus documentés à ce jour, différents travaux portant sur les interactions hémocytes de mollusques/vibrions ont mis en évidence quelques stratégies employées par ces bactéries et leurs produits extracellulaires pour échapper au système immunitaire.

Altération des défenses cellulaires de l'hôte

Des modifications morphologiques des hémocytes, et notamment un arrondissement de ces cellules, ont été observés par microscopie chez la moule *Mytilus edulis* en présence de *V. alginolyticus* NCMB 1339, de *V. anguillarum* ou de son surnageant de culture (Nottage et Birkbeck, 1990; Lane et Birkbeck, 1999). Ces mêmes modifications morphologiques ont également été observées sur les hémocytes de palourdes *Ruditapes philippinarum* en présence de *V. tapetis* (Choquet, *et al.*, 2003; Allam et Ford, 2006) ainsi que chez *Mya arenaria* en présence de *V. splendidus* (Mateo, *et al.*, 2009), et associées à une inhibition de leur capacité d'adhésion. Enfin, l'exposition des hémocytes de *C. gigas* aux produits extracellulaires de *V. aestuarianus* 01/032 entraîne également une inhibition dose-dépendante des capacités d'adhésion, un arrondissement et une agrégation des cellules hémocytaires ainsi qu'une perte de leurs extensions cytoplasmiques (Labreuche, *et al.*, 2006b).

L'internalisation dans des cellules non phagocytaires

Cette stratégie qui garantit une niche écologique protégée où la bactérie peut persister et se répliquer a été mise en évidence chez des souches de *V. hollisae* (Miliotis, *et al.*, 1995) et *V. parahaemolyticus* (Akedo, *et al.*, 1997) qui induisaient leur internalisation dans des lignées de cellules humaines grâce à des remaniements du cytosquelette.

La capsule

Afin d'échapper au système immunitaire de l'hôte, certaines bactéries sécrètent une capsule généralement constituée de polysaccharides peu solubles s'accumulant autour de la paroi (CPS). La biosynthèse de la capsule est déterminée par des facteurs génétiques et environnementaux. Barrière de perméabilité, cette capsule présente différentes fonctions : elle intervient 1. dans la prévention de la dessiccation favorisant la transmission et la survie dans une niche écologique mais également 2. dans la résistance à l'immunité non-spécifique et notamment aux mécanismes microbicides « post-internalisation » déclenchés au cours de la phagocytose entraînant une baisse de l'efficacité de cette réponse de l'hôte. Chez les pathogènes de vertébrés, la CPS peut être impliquée dans la résistance à l'immunité spécifique car les bactéries encapsulées sont moins immunogènes (Moxon et Kroll, 1990).

Chez *V. vulnificus*, l'encapsulation a été clairement associée à la virulence et en constitue le déterminant majeur: une mutation au niveau de l'opéron codant la CPS entraîne une diminution significative de la virulence (Wright, *et al.*, 1990) et une sensibilité des mutants à l'activité bactéricide du sérum humain (Yoshida, *et al.*, 1985). Par ailleurs, l'expression de la CPS inhiberait la constitution du biofilm bactérien (Joseph et Wright, 2004).

Chez *V. cholerae*, l'opéron *wbf* codant le sérotype O139 pathogène à l'origine d'épidémies, code également une capsule polysaccharidique impliquée dans les mécanismes de colonisation (Johnson, *et al.*, 1992; Waldor, *et al.*, 1994).

Inhibition de la production de ROS et production d'enzymes antioxydantes

Une autre stratégie élaborée pour échapper à la destruction par les phagocytes consiste à bloquer la synthèse des composés toxiques hématocytaires et/ou produire des enzymes antioxydantes. Une superoxyde dismutase produite par *V. shiloi* permet à cette bactérie de résister à ces composés microbicides (Banin, *et al.*, 2003), tout comme la catalase sécrétée par *Listonella* (= *Vibrio*) *anguillarum* qui détoxifie les ROS produites par les hématocytes de *C. virginica* (Bramble et Anderson, 1997; Bramble et Anderson, 1998). De plus, *V. pectinivora* pathogène des larves de la coquille Saint Jacques *Pecten maximus* est capable d'inhiber la production d'espèces oxygénées réactives (Lambert et Nicolas, 1998; Lambert, *et al.*, 2003).

Enfin, plus récemment, des travaux portant sur l'évolution de la production de ROS et de l'expression de l'enzyme Cg-EcSOD au niveau des hématocytes de *C. gigas* au cours d'une infection expérimentale à *V. aestuarianus* ont mis en évidence, dès le début de l'infection, une dérégulation du métabolisme oxydatif caractérisée par une stimulation de la production de ROS chez les hématocytes d'animaux injectés, concomitante à une diminution des niveaux de transcrits d'un gène codant une superoxyde dismutase Cg-EcSOD (Labreuche, *et al.*, 2006a). Ce stress oxydatif des cellules de

défense de l'hôte pourrait correspondre à un mécanisme de virulence spécifique de *V. aestuarianus*, lui permettant d'altérer les fonctions immunitaires de l'huître et la viabilité des hémocytes (Labreuche, 2006) (cf. paragraphe 1.4.1.1).

2.3.4 Régulation des mécanismes de virulence et quorum sensing

L'expression de la virulence est dépendante d'un grand nombre de facteurs externes, auxquels sont soumis en permanence les bactéries pathogènes (Igbinsa et Okoh, 2008). La capacité des bactéries pathogènes à réguler leurs facteurs de virulence leur confère un avantage sélectif certain qui leur permet d'investir une grande diversité de niches écologiques et de compartiments anatomiques de l'hôte (Mekalanos, 1992) et de s'adapter aux variabilités du milieu extérieur (Milton, 2006). Par le biais de mécanismes complexes impliquant de nombreuses protéines, la régulation de ces gènes se fait à différents niveaux, du génome (présence et amplification de gène, organisation en opéron et régulon, mécanismes de réarrangements géniques) à la maturation de protéines (modifications covalentes ou non-covalentes, clivage) en passant par la quantité des messagers transcrits et des protéines synthétisées (mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels). Différents types de facteurs régulent l'expression de la virulence des *Vibrio* : des facteurs environnementaux du milieu, comme la salinité, le pH, la qualité des nutriments ou la température et l'oxygène dissous (Hare, *et al.*, 1981; Igbinsa et Okoh, 2008), des facteurs de l'environnement interne de l'hôte (Guiney, 1997) ou encore des facteurs dépendants des bactéries environnantes et plus précisément, des systèmes de communication entre elles (Waters et Bassler, 2005).

Intensivement étudié depuis une dizaine d'années, le quorum sensing est un mécanisme de régulation contrôlant l'expression de certains gènes bactériens basé sur la capacité des bactéries à communiquer entre elles en utilisant des signaux moléculaires (Figure 32). Ce mécanisme contrôlé par la densité cellulaire régule des fonctions physiologiques importantes comme la bioluminescence, la conjugaison, la virulence ou encore la formation de biofilm, et ce de façon concertée au niveau de la population (Kaprelyants et Kell, 1996; Wirth, *et al.*, 1996; Fuqua et Greenberg, 1998; Schauder et Bassler, 2001; Bassler, 2002). Ce comportement coordonné est médié par des molécules autocrines diffusibles appelées phéromones ou autoinducteurs (Miller et Bassler, 2001; Waters et Bassler, 2005) : la concentration de ces molécules dans le milieu extracellulaire augmente parallèlement à l'accroissement de la population bactérienne et atteint un seuil induisant l'activation de l'expression de certains gènes.

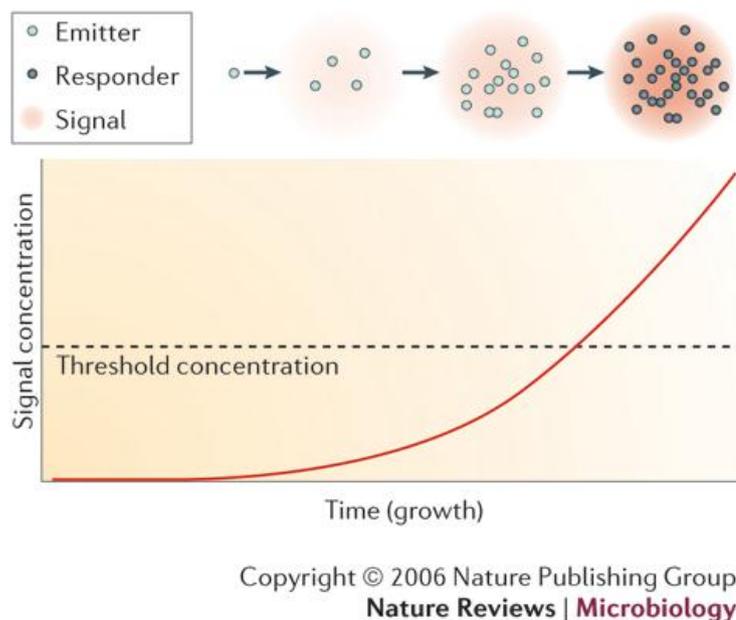


Figure 32 : Schéma générique du quorum sensing (Keller et Surette, 2006).

Dans sa forme la plus simple, la signalisation intercellulaire résulte de la production de molécules signal par des cellules émettrices et de leur accumulation dans le milieu extérieur. Passé une certaine concentration seuil, les molécules signal se lient à des récepteurs membranaires ou intracellulaires induisant une modulation de l'expression de certains gènes dans la cellule réceptrice. Concernant le quorum sensing au niveau intraspécifique, les cellules émettrices et les cellules réceptrices sont généralement les mêmes, comme illustré sur ce schéma.

Plusieurs systèmes de quorum sensing ont été décrits chez un grand nombre de bactéries Gram positif et Gram négatif et diffèrent par les caractéristiques des autoinducteurs impliqués et le mode de détection. Chez les bactéries Gram négatif, le premier système décrit dans la littérature est celui contrôlant la bioluminescence de *V. fischeri* qui nécessite une haute densité cellulaire (Engebrecht, *et al.*, 1983). Dans ce modèle, les autoinducteurs appelés acyl-homosérine lactones (acyl-AHL) et produits par la synthase LuxI, diffusent librement à travers la membrane bactérienne et provoquent, au-delà d'une concentration seuil, l'activation du régulateur transcriptionnel de la bioluminescence LuxR. Cette activation déclenche l'expression de gènes cibles dont le gène *luxI*. Ce système reposant sur la production d'AHL a aujourd'hui été identifié chez plus de 70 espèces différentes de bactéries Gram négatif et est à la base de la communication intraspécifique dépendante du résidu acyl, de nature et de taille variable selon les espèces.

V. harveyi est la bactérie la plus étudiée pour son système de quorum sensing « hybride » (Figure 33). En effet, il s'articule autour de trois voies parallèles qui convergent vers une même voie de signalisation régulant l'activité de LuxR *via* l'intervention de la protéine chaperonne Hfq et de quatre petits ARNs déstabilisant l'ARNm de LuxR (Bassler, *et al.*, 1997; Henke et Bassler, 2004b). Le

quorum sensing contrôle la bioluminescence de *V. harveyi* et régule aussi l'expression de sidérophores, d'une métalloprotéase et d'un système de sécrétion de type III (Henke et Bassler, 2004a). Les trois voies font intervenir des autoinducteurs et des signalisations différents, propres aux bactéries Gram négatif favorisant la communication intraspécifique (comme l'autoinducteur AI-1), mais également communs à de nombreuses espèces bactériennes suggérant des échanges interspécifiques (comme l'autoinducteur AI-2) (Bassler, *et al.*, 1997). Cette capacité de réponse à des niveaux intra et inter-spécifiques permettrait au vibron d'adapter la régulation de l'expression de certains gènes à la composition de la microflore dans laquelle il évolue (Milton, 2006).

Enfin, la troisième voie de quorum sensing identifiée chez *V. harveyi* est l'homologue de la voie CAI-1 (*cholerae* autoinducer-1) caractérisée chez *V. cholerae* (Parsek, 2007) et utilisée chez cette dernière pour inhiber sa virulence, à l'inverse de la plupart des bactéries pathogènes. Une hypothèse avancée pour cette régulation serait qu'à partir d'une certaine concentration, l'inhibition de sa virulence permettrait à *V. cholerae* d'échapper au système immunitaire de l'hôte et ainsi de se propager dans l'environnement (Lin, *et al.*, 2007).

Enfin, des travaux portant sur l'étude de la virulence de *V. anguillarum* pathogène de la truite *Oncorhynchus mykiss* ont montré l'implication des mécanismes de quorum sensing dans le développement d'une vibriose expérimentale chez ce poisson : l'utilisation d'un inhibiteur du quorum sensing a permis de réduire significativement les taux de mortalité induite expérimentalement par *V. anguillarum* (Rasch, *et al.*, 2004). Interrompre ou du moins perturber cette communication intracellulaire pourrait constituer une stratégie limitant le développement des maladies infectieuses en aquaculture (Defoirdt, *et al.*, 2004).

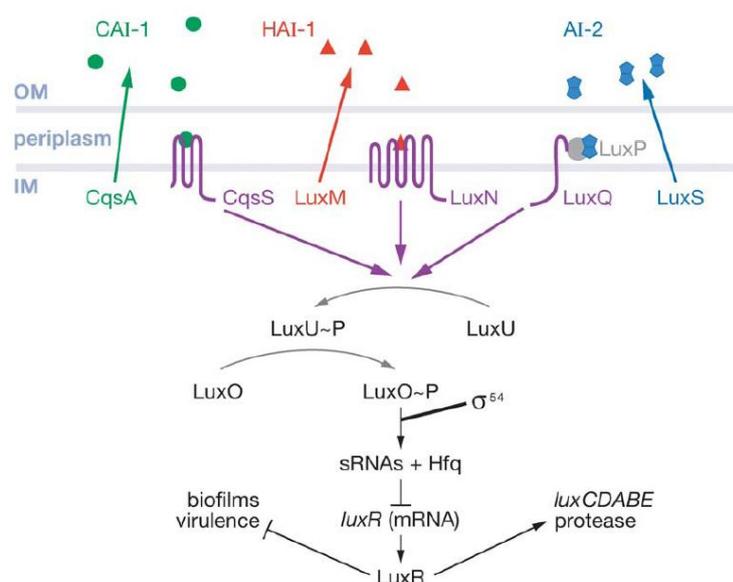


Figure 33 : Description des trois voies du quorum sensing décrites chez *V. harveyi* (Waters et Bassler, 2005).

OBJECTIFS ET APPROCHES DEVELOPPEES

Les travaux développés au cours de cette thèse portent donc sur l'étude de deux *Vibrio* pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, *Vibrio splendidus* et *Vibrio aestuarianus*. Avec comme objectif général d'apporter une meilleure compréhension des interactions reliant l'huître *C. gigas* et les deux *Vibrio* pathogènes, notre démarche a été la suivante :

1. décrire la signification épidémiologique *in situ* de ces deux *Vibrio* pathogènes dans une étude préliminaire, définir des outils intégrés et adaptés à l'étude d'interactions entre les deux vibriens pathogènes et leur hôte et explorer certains mécanismes de virulence ;
2. analyser la variabilité de la réponse de l'huître creuse à une vibriose expérimentale par co-injection de *V. splendidus* LGP32 et *V. aestuarianus* 02/041 en relation avec trois facteurs susceptibles de moduler celle-ci : la gamétogenèse, la ploïdie et la génétique ;
3. enfin, étudier la pathogenèse par la description des dynamiques d'infection et la réponse de l'huître à un niveau transcriptionnel par le biais d'un mode d'infection expérimentale non invasif.

Les travaux rapportés sont organisés en trois chapitres :

- **Le premier chapitre** porte sur une analyse de l'importance épidémiologique de *V. splendidus* et *V. aestuarianus* dans les épisodes de mortalité estivale survenant dans les élevages français d'huîtres creuses entre 2003 et 2007. Une analyse en taxonomie moléculaire par séquençage du gène codant l'ARN 16S confirme la prédominance de ces deux espèces dans les phénomènes de mortalité estivale. De plus, une corrélation entre pouvoir pathogène et activité métalloprotéasique est suggérée, pouvant constituer un test phénotypique rapide prédictif de la virulence. Par ailleurs, un effet synergique entre deux souches *V. splendidus* LGP32 et *V. aestuarianus* 02/041 injectées en infection expérimentale dans le muscle adducteur d'huîtres creuses est mis en évidence et exploité pour la mise au point d'un outil d'infection expérimental ajusté, permettant la reproduction d'une co-vibriose expérimentale. Des outils diagnostiques sensibles et spécifiques des deux souches de *Vibrio* hautement pathogènes appartenant aux espèces *V. splendidus* et *V. aestuarianus* basés sur l'utilisation de la PCR en temps réel et l'emploi de sondes Taqman ont été développés et permettent l'identification rapide et

la quantification de ces vibrions pathogènes dans les tissus de l'hôte et de son proche environnement. Enfin, l'exploration *in vitro* de ce phénomène de synergie a permis la mise en évidence d'un mécanisme de quorum sensing régulant la production et l'expression au niveau transcriptionnel des métalloprotéases Vsm et Vam aux niveaux intra- et interspécifique.

- **Le deuxième chapitre** porte sur l'étude de l'influence de trois facteurs de l'huître creuse sur sa sensibilité à une vibriose expérimentale : la gamétogenèse, le niveau de ploïdie et la composante génétique. Dans une première approche, la réalisation d'une infection expérimentale par balnéation sur des animaux présentant des stades de gonadogenèse contrastés a souligné d'une part, l'importance de la reproduction et des phénomènes de pontes dans la transmission des *Vibrio* pathogènes. D'autre part, l'affinité de *V. splendidus* LGP32-GFP pour le tissu gonadique a été observée grâce à un outil d'analyse immunohistologique spécifique développé dans le cadre de ce travail. Dans une seconde approche, des familles de demi-frères diploïdes et triploïdes ont été testées en infection expérimentale à quatre stades de gonadogenèse différents, par injection intramusculaire d'une suspension bactérienne de *V. splendidus* et *V. aestuarianus*. Les effets de la gonadogenèse et du niveau de ploïdie sur la sensibilité des huîtres à une vibriose expérimentale ont été analysés au regard des théories énergétiques d'écophysiologie. Les résultats rendent compte d'une sensibilité accrue de l'huître en période de gamétogenèse active et de capacités de résistance similaires des huîtres diploïdes et triploïdes à une vibriose expérimentale. Enfin, l'étude des performances de survies à des infections expérimentales de 14 familles consanguines issues du programme de sélection divergente initié dans le cadre de MOREST a permis d'illustrer l'existence d'une base génétique de la résistance des huîtres à une vibriose expérimentale.

- **Le troisième chapitre** présente une étude de pathogenèse à *V. splendidus* et *V. aestuarianus* chez des huîtres mises en contact par cohabitation avec des huîtres expérimentalement infectées par injection. L'exploration des interactions liant l'huître creuse *C. gigas* et les *Vibrio* virulents, *V. splendidus* LGP32-GFP et *V. aestuarianus* 02/041, ou non virulents présents naturellement dans la flore endogène de l'hémolymphe ou dans l'eau des aquariums est documentée par le suivi qualitatif et quantitatif 1. de la flore vibrionacée totale dans l'hémolymphe et dans l'eau des bacs, 2. des deux agents pathogènes utilisés *V. splendidus* LGP32 et *V. aestuarianus* 02/041 dans l'hémolymphe et dans l'eau des bacs et enfin, 3. des niveaux de transcrits de quatre gènes hématocytaires potentiellement impliqués dans les mécanismes de défense de l'huître creuse. Cette nouvelle approche a permis de mettre en évidence la rapidité de transmission des *Vibrio* virulents des huîtres infectées aux huîtres sentinelles intervenant en moins de deux heures. Ce phénomène est accompagné d'une perturbation significative, précoce et transitoire de la réponse immunitaire de l'hôte au cours des six premières

heures de cohabitation. Cependant, compte tenu de la stabilité relative retrouvée des niveaux de transcrits mesurés aux temps ultérieurs (6h, 24h et 48h), il semblerait que les gènes ciblés dans cette étude ne soient pas ou peu corrélés aux mécanismes de résistance aux vibrioses expérimentales. Enfin, la prise en charge différentielle des *Vibrio* pathogènes et des *Vibrio* commensaux par l'huître suggère l'existence de mécanismes conduisant à une spécificité des réponses de l'huître visant l'élimination des *Vibrio* pathogènes et le maintien d'une flore vibrionacée endogène probablement bénéfique pour *C. gigas*.

CHAPITRE 1

***V. SPLENDIDUS* ET *V. AESTUARIANUS* :**

EPIDEMIOLOGIE ET VIRULENCE,

OUTILS DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION.

Sommaire du Chapitre 1

- 1 Article 1 :** **99**
A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity.
- 2 Article 2 :** **139**
Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: a useful tool for epidemiologic studies.
- 3 Résultats annexes :** **160**
Synergie, métalloprotéases et quorum sensing.

1 Article 1 : A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity.

Denis Saulnier, Sophie De Decker, Philippe Haffner, Laetitia Cobret, Maeva Robert, Céline Garcia

Microbial Ecology, 2010, vol. 59, p. 787-798

DOI 10.1007/s00248-009-9620-y

Introduction

Au cours de ces dernières années, plusieurs études ont visé l'identification et la caractérisation des bactéries associées à différents épisodes de mortalité de *C. gigas* observés en France entre 1997 et 2003. Des analyses bactériologiques de phénotypie classique et de génotypie ont été réalisées sur différents échantillons de naissains et d'adultes prélevés au cours d'épisodes de mortalités estivales sur les côtes françaises. Ces analyses ont permis d'identifier deux espèces de *Vibrio*, *Vibrio splendidus* et *V. aestuarianus* fréquemment associées à ces épisodes (Lacoste, *et al.*, 2001; Le Roux, *et al.*, 2002; Waechter, *et al.*, 2002; Gay, *et al.*, 2004a; Gay, *et al.*, 2004b; Garnier, *et al.*, 2007). Cependant, ces deux espèces de *Vibrio* n'ont pas été systématiquement associées aux épisodes étudiés et ne peuvent être considérées comme étant les agents causaux uniques de ces phénomènes dont l'étiologie apparaît multifactorielle (Samain et McCombie, 2008). De plus, ces études ont été réalisées sur des échantillons d'huîtres moribondes ne provenant que d'un nombre limité d'épisodes de mortalité.

Des approches de typage polyphasique ont été développées pour la caractérisation taxonomique des isolats bactériens d'intérêt : alors que le groupe de souches identifiées comme appartenant à l'espèce *V. aestuarianus* apparaît très conservé d'un point de vue génétique, il a été mis en évidence une grande diversité génétique au sein du groupe *V. splendidus*, suggérant sa nature polyphylétique. Par ailleurs, le pouvoir pathogène de ces souches isolées pour *C. gigas* a été testé en infection expérimentale révélant une pathogénicité variable au sein des groupes *V. splendidus* (Le Roux, *et al.*, 2002; Gay, *et al.*, 2004a) et *V. aestuarianus* (Garnier, *et al.*, 2007). Les techniques phénotypiques et génotypiques utilisées dans ces travaux n'ont pas permis de distinguer les isolats pathogènes des isolats non pathogènes appartenant au groupe phylogénétique *V. splendidus* (Le Roux, *et al.*, 2002) : l'infection expérimentale reste donc la seule méthode d'évaluation de la virulence d'une souche.

Enfin, des travaux portant sur les supports génétiques de la virulence de ces deux espèces ont révélé le rôle clé de métalloprotéases, enzymes connues pour être notamment impliquées dans les processus infectieux décrits chez *V. cholerae* et *V. vulnificus* (Miyoshi et Shinoda, 2000). Le développement d'un système de génétique inverse pour la réalisation de mutants de *V. splendidus* a permis de démontrer que la métalloprotéase Vsm est un facteur clé de létalité des produits extracellulaires de la souche LGP32 (Gay, *et al.*, 2004a) lorsqu'ils sont injectés aux huîtres (Le Roux, *et al.*, 2007; Binesse, *et al.*, 2008). De plus, une approche biochimique a mis en évidence le rôle clé de la métalloprotéase Vam dans la toxicité du sécrétome de *V. aestuarianus* (Labreuche, *et al.*, 2006a).

Objectifs

Les objectifs de cette étude étaient doubles :

1. Compte tenu du caractère multifactoriel de l'origine des mortalités estivales de *C. gigas*, et de l'absence d'étude d'identification systématique des isolats cliniques bactériens depuis 2003, il est apparu important au commencement de ce travail de thèse d'étudier la diversité spécifique des souches bactériennes isolées dans un contexte de mortalité estivale sur une large échelle de temps (de 2003 à 2007) et d'espace (l'ensemble du littoral français et plusieurs types de structures de production). Cette analyse épidémiologique bactérienne devait permettre outre l'exploration de la diversité spécifique bactérienne associée à des phénomènes de mortalité, d'étudier plus précisément l'occurrence des deux espèces *V. splendidus* et *V. aestuarianus* fréquemment incriminées dans de tels épisodes de mortalités estivales, et de confirmer ainsi leur importance épidémiologique et leur implication potentielle dans ces épisodes observés sur l'ensemble du littoral français. Cette étude a été étendue à trois autres espèces de mollusques d'intérêt aquacole, la coquille Saint-Jacques (*Pecten maximus*), la palourde (*Ruditapes phillipirum*) et l'ormeau (*Haliotis tuberculata*).
2. Le deuxième objectif visait à documenter la virulence de plusieurs de ces souches isolées appartenant aux groupes les plus fréquemment associés aux épisodes de mortalité étudiés, à savoir *V. splendidus*, *V. aestuarianus*, *V. harveyi* et *Shewanella colwelliana* : leur pathogénicité pour *C. gigas* a été testée en infection expérimentale par injection intra-musculaire. Si cet outil reste indispensable à l'évaluation précise du pouvoir pathogène d'une souche bactérienne, sa mise en place reste lourde à mettre en œuvre et peut apparaître comme une méthode ne permettant pas un criblage massif des bactéries pathogènes dans des études épidémiologiques à large échelle. Les deux espèces, *V. splendidus* et *V. aestuarianus* pouvant produire des métalloprotéases associées à la virulence (Vsm et Vam respectivement), la capacité des souches étudiées à produire une activité de type métalloprotéase a été mesurée dans leur surnageant de culture. L'utilisation de ce test comme indicateur du degré de virulence en première approche a été proposée et évaluée. Ce test devrait permettre un criblage d'un grand nombre de souches virulentes dans le cadre d'études épidémiologiques en amont des approches d'infection expérimentale.

Méthodologie

L'étude épidémiologique a été effectuée sur des échantillons prélevés dans le cadre du suivi zoosanitaire des mortalités anormales de mollusques assuré par le réseau REPAMO. Au cours des années 2003, 2004, 2005 et 2007, quatre-vingt-douze épisodes de mortalité, principalement chez *C. gigas* (73/92), ont été couverts par le REPAMO : les prélèvements d'animaux sains et d'animaux apparemment malades, provenaient essentiellement de fermes privées réparties sur tout le littoral français (écloserie, nurserie, parcs ostréicoles en Atlantique, Manche et Méditerranée) mais également d'infrastructures expérimentales de l'Ifremer (La Tremblade, Argenton). En fonction de l'espèce de mollusque et de l'âge des animaux concernés (de la larve à l'adulte), différents types de tissus ont été préparés pour les analyses bactériologiques. L'ensemble des morphotypes bactériens les plus abondamment retrouvés sur les milieux de culture ($> 10^4$ CFU/mL) a été isolé et conservé par cryocongélation. L'identification taxonomique de l'intégralité de ces isolats a été effectuée par génotypage de deux gènes de ménage d'intérêt phylogénétique, l'ADNr16S et le gène *gyrB* concernant les souches du groupe *V. splendidus*, selon les méthodes décrites par Lambert *et al.* (1998) et Yamamoto et Harayama (1995). L'activité de type métalloprotéase des surnageants de culture de ces isolats a été mesurée selon une méthode inspirée de celle décrite par Téou *et al.* (2003). Enfin, leur pathogénicité pour *C. gigas* a été évaluée en infection expérimentale par injection dans le muscle adducteur des cellules bactériennes issues de culture pure de 20h à 20°C dans du milieu Marine Broth. Des témoins négatifs d'huîtres recevant une injection d'eau de mer stérile ont été constitués et les souches pathogènes caractérisées *V. splendidus* LGP32 et *V. aestuarianus* 02/041 ont été utilisées en tant que contrôles positifs.

Résultats et discussion

1. Prédominance épidémiologique du groupe de *V. splendidus* et de l'espèce *V. aestuarianus* associée aux épisodes de mortalité de *C. gigas* en France entre 2003 et 2007

Associé à 92 épisodes de mortalité déclarés principalement en période estivale, un total de 115 isolats bactériens provenant pour la plupart d'échantillons d'animaux malades et retrouvés dominants sur boîte de culture ont été identifiés par typage du gène ADN_r16S : une analyse phylogénétique réalisée sur 109 de ces souches a révélé que plus de 50% de ces isolats étaient apparentés aux groupes polyphylétique de *V. splendidus* (28%) et monophylétique de *V. aestuarianus* (22%), confirmant l'importance épidémiologique et l'implication potentielle de ces deux groupes dans l'apparition de ces phénomènes de mortalité.

La distribution géographique des souches isolées chez *C. gigas* au cours d'épisodes de mortalité estivale a montré que ces deux espèces de *Vibrio* étaient le plus fréquemment détectées dans les échantillons d'huîtres provenant de parcs ostréicoles par comparaison aux structures à terre privées (écloserie, nurseries), suggérant la présence naturelle de ces *Vibrio* sur l'ensemble des sites ostréicoles français étudiés. De plus, il est intéressant de noter qu'aucune souche *V. aestuarianus* n'a été détectée au cours de cette étude chez des huîtres provenant de Méditerranée, c'est-à-dire entre 2003 et 2007. Or, durant les épisodes de mortalité 2008, en mai précisément, l'espèce *V. aestuarianus* a été détectée sur un lot d'huîtres juvéniles méditerranéennes (étang de Thau) suggérant ainsi une évolution rapide des associations bactériennes observées au cours d'épisodes de mortalité (François, *et al.*, 2009a) : l'intérêt des suivis épidémiologiques de grande ampleur des bactéries potentiellement pathogènes n'en est que plus prononcé et permettrait la définition d'une qualification pertinente des animaux avant transfert intersites.

Par ailleurs, deux autres divergences dans la détection de ces deux groupes ont été mises en évidence. D'une part, si les souches de type *V. splendidus* ont été isolées d'huîtres issues de deux types de structures de production privée, terrestres et parcs ostréicoles, *V. aestuarianus* est essentiellement retrouvé associé à des huîtres provenant de parcs ostréicoles et des infrastructures Ifremer. Ceci suggère que les pratiques zootechniques propres aux structures semi-fermées de stabulation des animaux peuvent favoriser sa présence et son développement. On ne peut cependant pas exclure que la proximité des huîtres étudiées dans les infrastructures de l'Ifremer facilite l'observation et la surveillance des lots, notamment de l'apparition du symptôme de fragilité musculaire, et permet une plus grande réactivité dans l'échantillonnage. D'autre part, les souches isolées apparentées à *V. aestuarianus* sont essentiellement associées à des huîtres juvéniles et adultes (> 3cm) alors que les

souches apparentées au groupe de *V. splendidus* sont impliquées dans des épisodes de mortalité touchant toutes les classes d'âge. Ces divergences épidémiologiques illustrent les différences écologiques observées entre ces deux *Vibrio*, influençant probablement leur rôle dans le déclenchement des mortalités et leur évolution, ainsi que leur stratégie de virulence. En effet, le groupe *V. splendidus*, communément décrit dans la littérature comme étant l'espèce de *Vibrionaceae* la plus abondante du bactérioplancton durant la saison chaude principalement (Thompson, *et al.*, 2005), apparaît dans notre étude plus ubiquiste et majoritaire chez *C. gigas* que l'espèce *V. aestuarianus*. La prédominance du groupe *V. splendidus* dans les 32 épisodes de mortalité étudiés survenus chez trois autres mollusques d'intérêt économique, *P. maximus*, *R. philippinum* et *H. tuberculata*, corrobore le caractère ubiquiste de ce groupe.

Les deux autres espèces de bactéries les plus fréquemment détectées chez *C. gigas* au cours de cette étude ont été identifiées comme étant apparentées au groupe polyphylétique de *V. harveyi* (27/115), pathogène connu de poissons et de crustacés (Austin et Zhang, 2006) et dans une moindre mesure à l'espèce *Shewanella colwelliana* (11/115). Aucune de ces deux espèces n'avait été associée, à notre connaissance, à des épisodes de mortalités chez des huîtres creuses ou autres mollusques bivalves. Il est intéressant de noter que la grande majorité des souches de *V. harveyi* identifiées au cours de cette étude (2003-2007) a été détectée durant les épisodes de mortalité survenus en 2007 (25/27). La quasi-totalité des souches *V. harveyi* testées en laboratoire, six parmi sept sélectionnées, s'est révélée être extrêmement virulente en infection expérimentale en induisant des taux de mortalité supérieurs à 60% en moins de 24 heures post-injection intramusculaire. De ce fait une surveillance épidémiologique de ce groupe *V. harveyi* apparaît donc nécessaire afin d'évaluer son potentiel d'émergence dans les mortalités de l'huître creuse en France (François, *et al.*, 2009a). En revanche 4 des cinq souches *Shewanella colwelliana* testées en infection expérimentale se sont révélées être non pathogènes, la dernière présentant une virulence modérée avec 40% de mortalités cumulées sur la durée du suivi, ce qui rend l'intérêt d'un suivi épidémiologique de cette espèce moins prégnant.

Durant les épisodes de mortalité d'huîtres creuses *C. gigas* survenus depuis 2008, qui sont exceptionnels de par leur ampleur, *V. harveyi* a été détecté chez 33% des lots (n=60) ayant fait l'objet d'un examen en 2008 pour la recherche des agents infectieux de nature bactérienne et virale (OsHV-1). En revanche, en 2009, cette bactérie n'a été trouvée associée que pour un lot parmi 61 analysés (François, *et al.*, 2010).

2. Co-détection et effet de synergie

Plusieurs cas de co-détections de souches dominantes apparentées à *V. splendidus* et à *V. aestuarianus* ont été observés dans un même échantillon individuel d'huître. De ce fait, des essais de co-injection des deux souches pathogènes caractérisées *V. splendidus* LGP32 (Gay, *et al.*, 2004a) et *V. aestuarianus* 02/041 (Garnier, *et al.*, 2007) ont été réalisés dans cette étude en infection expérimentale chez *C. gigas*. La co-injection de ces deux souches induit des taux de mortalité supérieurs à ceux obtenus après l'injection d'une unique souche, permettant d'abaisser la DL50 d'un facteur compris entre 10 et 100 : cet effet de synergie dans la pathogénicité de ces deux souches suggère l'existence de mécanismes de virulence non caractérisés et impliqués dans l'expression de leur pathogénicité. Précédemment décrits chez des huîtres injectées expérimentalement avec deux souches du groupe *V. splendidus* (Gay, *et al.*, 2004b), nommées LGP32 et LGP31, de tels phénomènes de synergie pourraient intervenir dans l'apparition ou l'intensification de mortalité dans les élevages de *C. gigas in situ*.

3. Corrélation entre pathogénicité et activité métalloprotéase

Un total de 38 souches appartenant aux 4 groupes dominants associés à des épisodes de mortalité, *V. splendidus*, *V. aestuarianus*, *V. harveyi* et *S. colwelliana* a été sélectionné parmi les 115 identifiées, en choisissant au sein de ces espèces les souches les plus différenciées en terme d'origine géographique et de date d'isolement : leur pathogénicité pour *C. gigas* a été testée par injection expérimentale des bactéries vivantes. L'intégralité des souches apparentées à *V. aestuarianus* (10/10) et *V. harveyi* (9/9) testées s'est avérée être virulente chez *C. gigas*, alors que les souches *S. colwelliana* sont apparues pour la plupart non virulentes (4 non virulentes sur 5 testées). Les souches apparentées au groupe de *V. splendidus* présentent une virulence variable (9 virulentes sur 14 testées). De plus, le pic d'infection induit par les souches virulentes est observé entre le 1^{er} et le 2^{ème} jours post-injection de souches apparentées à *V. splendidus* et entre le 2^{ème} et le 3^{ème} jours post-injection de souches apparentées à *V. aestuarianus* : cette différence de cinétique dans la pathogénèse suggère une différence dans les mécanismes de virulence impliqués chez ces deux espèces.

La mesure de l'activité métalloprotéasique des surnageants de culture de chacune de ces 38 souches a permis de mettre en évidence une corrélation de 84% entre cette activité et la virulence des souches évaluée par infection expérimentale : ceci illustre l'importance du rôle des métalloprotéases dans la pathogénèse induite par ces quatre différents groupes bactériens chez *C. gigas*. Même si la métalloprotéase n'apparaît pas comme l'unique facteur déterminant la virulence des souches testées

(trois souches virulentes sont dénuées d'activité de type métalloprotéasique *in vitro*), elle apparaît cependant comme un facteur potentiel répandu chez les bactéries pathogènes associées à des épisodes de mortalité de *C. gigas* en France. De ce fait, ce test phénotypique rapide à réaliser peut constituer une alternative à l'infection expérimentale dans des études épidémiologiques à grande échelle, pour l'évaluation de la virulence d'isolats bactériens ou du moins, un outil de criblage dans une première approche.

NB : Une conclusion et des perspectives de ce travail, ouvrant notamment sur l'article 2 (cf. partie 2 du chapitre 1) apparaissent à la suite de l'article 1.

Title

A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity.

Microbial Ecology, Microbial Ecology, 2010, vol. 59, p. 787-798

DOI 10.1007/s00248-009-9620-y

Authors

Denis Saulnier^{1*}, Sophie De Decker¹, Philippe Haffner¹, Laetitia Cobret¹, Maeva Robert¹, Céline Garcia¹

¹ Laboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER, av. du Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France

* Corresponding author: Denis Saulnier

Laboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER, BP 33, av. du Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France

Tel: 33 5 46 76 26 46, Fax: 33 5 46 76 26 11, denis.saulnier@ifremer.fr

Abstract

A four-year bacteriological survey (2003-2007) of four molluscs cultivated in France and faced with mortality episodes was performed by the French shellfish pathology network. The more abundant bacteria isolated during 92 mortality episodes, occurring mainly in Pacific oyster *Crassostrea gigas*, were identified by genotyping methods.

It allowed us both to confirm the representativeness of *V. splendidus* and *V. aestuarianus* bacterial strains and to identify both a large number of *V. harveyi*-related strains mainly detected during 2007 oyster mortality outbreaks and to a lesser extent bacterial strains identified as *Shewanella colwelliana*. Because metalloprotease has been reported to constitute a virulence factor in a few *Vibrio* strains pathogenic for *C. gigas*, several bacterial strains isolated in this study were screened to evaluate their pathogenicity in *C. gigas* spat by experimental infection and their ability to produce metalloprotease-like activity in the culture supernatant fluids. A high level (84%) of concordant results between azocaseinase activities and virulence of strains was obtained in this study. Because bacterial metalloprotease activities appeared as a common feature of pathogenic bacteria strains associated with mortality events of *C. gigas* reared in France, this phenotypic test could be useful for the evaluation of virulence in bacterial strains associated with such mortality episodes.

Keywords

Oyster, *Crassostrea gigas*, pathogens, *Vibrio*, metalloprotease, mortality

Introduction

Vibrio are ubiquitous marine bacteria that represent a major source of concern in aquaculture due to the increasing number of strains and species found to be pathogenic for fish and shellfish. Such pathogens can cause severe production losses in the industry. The main aquaculture activity in France is the rearing of Pacific oysters *Crassostrea gigas*, but it has recurrently suffered large scale summer mortality phenomena over the last 15 years [1]. In particular, *V. aestuarianus* [2, 3] and *V. splendidus* [4, 5] have been reported to be associated with summer mortality of oyster spat reared in open sea tidal areas and, to a lesser extent, in older animals [6]. Some bacterial isolates related to these *Vibrio* species were demonstrated to be pathogenic to *C. gigas* under experimental conditions [3, 5, 7]. Despite these findings, the aetiology of summer mortalities seems to be multifactorial, arising as a result of complex interactions between the physiological and/or genetic status of the host, the environment and known or as yet unidentified pathogen/s [7, 8]. Indeed, another infective agent - a herpes-like virus - has also been associated with mortality episodes, although not systematically [8]. Besides *V. aestuarianus* and *V. splendidus*, another bacterial species not yet reported in France, *V. tubiashii*, has been found to be responsible for a serious disease in North American hatchery-reared *Crassostrea virginica* oysters [9] and *C. gigas* [10, 11].

Various extracellular proteases that play an important role in the pathogenesis of bacterial infections have been described in *Vibrio* isolated from seawater, fish and shellfish [12-16]. Proteases may be involved in tissue invasion and destruction, host defence evasion and its modulation [17]. Many proteases belong to the metalloprotease family [18]. Those produced by human pathogenic bacteria, including *V. cholerae* and *V. vulnificus*, have been studied extensively, evidencing a broad range of pathological actions [19]. Metalloproteases have been also described in some *V. tubiashii*, *V. aestuarianus* and *V. splendidus* strains pathogenic to Pacific oyster *C. gigas* [20-22]. It has been recently shown by mutagenesis that those produced by two strains related to *V. tubiashii* and *V. splendidus* are an essential determinant of lethality when extracellular products are injected into *C. gigas* oysters [9, 21, 23, 24].

In previous studies, *V. splendidus* and *V. aestuarianus* strains associated with mortality episodes of cultivated *C. gigas* oysters in France were isolated in (1) sentinel animals that had been kept in experimental cohabitation in an aquarium with presumed diseased animals collected from areas where mortality episodes were noted [25], or (2) in temporally and spatially limited mortality outbreaks [3, 4]. The first aim of the present study was to increase the number of identified bacteria associated with mortality episodes, mainly in cultivated Pacific oysters but also in three other mollusc species cultivated in France. This was done during a four-year bacteriological survey, allowing us to evaluate

the representativeness of *V. splendidus* and *V. aestuarianus* bacterial strains. The second aim of the present study was to screen several of the bacterial strains found to be more frequently associated with mollusc disease outbreaks, to evaluate both their pathogenicity in *C. gigas* spat by experimental infection and their ability to produce metalloprotease-like activity in culture supernatant fluids. Results from these investigations allowed us to correlate metalloprotease activity and virulence capacity.

Materials and methods

Sampling and bacterial isolation

Abnormal mortality in mollusc aquaculture is defined by European Directive 95/70/EC as a sudden mortality affecting approximately 15 % of stocks and occurring over a short period between two inspections (within 15 days). In practice, the study of abnormal mortality in France is the subject of passive monitoring: mollusc mortality cases are reported by farmers to the competent authority and the French network of shellfish pathology, known as REPAMO, records and performs analyses on the animals. Mortality rate is estimated by counting a proportion of live and dead animals in three randomly chosen bags per oyster lease, three randomly chosen tanks in hatcheries-nurseries or in three different squares for clam and scallop beds.

Over four years of zoosanitary monitoring performed by the REPAMO network (2003, 2004, 2005 and 2007), 92 batches of animal samples were collected from abnormal mortality episodes affecting 4 cultivated mollusc species. Samples were mainly Pacific oysters *C. gigas* (80 % of samples), but also scallops *Pecten maximus* (3 %), clams *Ruditapes philippinarum* (5 %) and abalone *Haliotis tuberculata* (12 %). The affected animals mainly came from private farms, in 36 different locations along the Atlantic, English Channel or Mediterranean coasts of France; 47 % of oyster samples came from two IFREMER experimental facilities. Animals presumed to be diseased were shipped at 4 °C by express courier (<24 hours) to the IFREMER pathology laboratory. Bacterial isolations were only made from animals that were still alive on arrival. Generally, two apparently healthy animals and at least three diseased animals exhibiting a weakness in adductor muscle tonicity were examined and analysed by bacteriological methods. In order to prevent any risk of bacterial contaminations from diseased to apparently healthy animals, each group of animals was shipped in a different plastic bag. Depending on mollusc species and age of the animals, different tissues were sampled in sterile conditions for bacteriological analysis: haemolymph was taken for each oyster or abalone; a piece of adductor muscle, gill and mantle mixed together for each scallop; and a mixture of five mantles from individual clams. All these tissues were prepared using five individuals or five pools of animals from each batch, and in each case corresponded either to an all-adult or all-juvenile age class. Haemolymph was withdrawn into a syringe from the adductor muscle or pericardial cavity of oysters and from the pericardial cavity of abalones, using a 23-gauge needle. Tissues from scallop and clams were homogenized in 100 µl Sterile Artificial Sea Water diluent (SASW 2.3 % NaCl, 20 mM KCl, 5 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂) with a sterile pellet-pestle (Sigma) for 1 minute on average. For larvae and early spat stages (shell size smaller than 3 cm in length), several whole animals were taken and disrupted in SASW as a single pool of individuals for each batch sample.

Tissue samples diluted in SASW (10 to 1000×) were spread on Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose (TCBS, Difco) agar in Petri dishes. After incubation of plates at 20 °C for at least 4 days, each macroscopically different bacterial isolate found in abundance (more than 10⁴ CFU/ml) was re-plated on nutrient Petri dishes to check for purity. Each isolate was identified by eight figures, the first two indicating the year of batch reception, the next three indicating the batch number and the last ones giving the sample tissue number followed by the colony type (T) number.

Genotyping

Bacterial isolates were cultured overnight at 20 °C in marine broth (Difco), and 65 µl of bacterial suspension were deposited on FTA® paper matrix cards according to the manufacturer's instructions (Whatman) for nucleic acids extraction and storage. The 16S rRNA and *gyrB* genes were amplified using universal bacterial primer pairs SAdir (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAGA-3'), S17rev (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3') and Up1E (5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA YGCN GGNGGNAARTTYRA-3'), UP2R (5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTC NACRTCNGCRTCNGYCAT-3'), following methods described by Lambert et al. [26] and Yamamoto and Harayama [27], respectively. The amplicons with the expected size were purified using a Microcon PCR filter kit (Millipore). Purified PCR products were mixed (final volume 10 µl) with 0.4 µl ABI Prism Big Dye Terminator ready reaction mix (Applied Biosystems), 0.75 µM forward primer using SAdir for the 16S rRNA sequencing reaction and Up1S 5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA-3' for *gyrB* sequencing. Cycle sequencing reactions were performed using a Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems) following manufacturer's instructions. Separation of the DNA fragments was carried out in an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Sequences were then compared against those of the type strains of validly published species using Eztaxon [28]. Sequences from bacterial isolates and closed type strains were aligned with BioEdit [29] and phylogenetic trees were built using Mega4 [30] and the Neighbour-Joining method with the Kimura two-parameter model. Reliability of topologies was assessed by the bootstrap method [31] with 1000 replicates.

Metalloprotease-like activity in culture supernatant fluids

Proteolytic activity in culture supernatant fluids (CSF) was determined using azocasein (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) as a substrate, according to the method of Teo et al, [32] with slight modifications. Briefly, pure bacterial culture was incubated in Marine Broth (Difco) at 20 °C for 48 h on a shaker to yield stationary phase. Bacterial concentrations ranged between 5×10^7 and 2×10^8 CFU/ml according to bacterial strains, as evaluated by the plate-counting method using appropriate dilution. Culture supernatant fluids were harvested by centrifugation ($3200 \times g$, 20 °C, 10 min), and 250 µl CSF were added to 250 µl azocasein (5 mg/ml) prepared in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0). The mixture was incubated at 37 °C for 2 h and the reaction stopped by adding 500 µl cold 10 % trichloroacetic acid. After centrifugation at 12 000 g and 4 °C for 5 min, 500 µl of the supernatant were mixed with 500 µl 1 M NaOH and the absorbance measured at 440 nm. One unit of protease activity was defined as the amount of enzyme that caused an increase of 0.01 absorbance unit after 2 h incubation at 37 °C [32].

To confirm metalloprotease-like activity in culture supernatants, CSF were assayed with azocasein under the conditions described above, adding a CSF preincubation step at 20 °C for 30 min in the presence of metalloprotease inhibitors 8 mM 10-phenanthroline or 40 mM EGTA [32].

Experimental infections

Bacteria were grown at 20 °C for 20 h in marine broth under constant shaking. The bacterial culture concentrations were evaluated spectrometrically at an optical density (OD) of 600 nm. Cells were centrifuged at 3200 g for 10 min, the supernatant discarded and the resulting pellet resuspended in SASW to obtain an OD of 1. Ten- to twelve-month-old oyster spat were anaesthetised for 1 to 2 hours at 20 °C in a solution of magnesium chloride (28 g/L $MgCl_2$) supplemented with phytoplankton (*Isochrysis galbata* and *Chaetoceros calcitrans*) under aeration. Subsequently, 100 µL of bacterial suspension were injected into the adductor muscle. A group of oysters were injected with SASW to serve as negative controls. Virulent *V. splendidus* LGP32 strain [3, 5] and *V. aestuarianus* 02/041 strain [3] isolated in experimental cohabitation trials and from the IFREMER experimental hatchery at Argenton (Brittany, France), respectively, were used as positive controls. After injection, oysters were transferred to tanks (20 to 30 oysters in 2 L) filled with 1 µm-filtered seawater at 3.1‰ of salinity and maintained under static conditions at 20 °C with aeration. Mortality was monitored daily and any newly dead oysters were removed from the tanks over a seven-day period.

Results

Phylogenetic analysis

A total of 183 bacterial isolates were obtained from four cultivated mollusc species collected during mortality episodes (n=92). All isolates were found dominant by the plate culture method at 1000 x dilution. They were mainly isolated from diseased animals, in contrast to results with apparently healthy animals originating from a same batch, where no cultivable bacteria were observed at the same dilution. Small-subunit ribosomal RNA genes of these isolates were partially sequenced (around 700 bp). Sequence comparisons between isolates of a single tissue sample revealed that identical nucleotide sequences could be obtained, revealing the existence of 147 tissue sample-specific strains. Phylogenetic analysis (Fig. 1) of 120 strains with high quality sequences revealed that most of these strains clustered with reference strains of bacterial species related to polyphyletic groups of *Vibrio splendidus* (38 strains) or *V. harveyi* (32), and monophyletic groups of *V. aestuarianus* (18), *Shewanella colwelliana* (9), *V. chagasii* (5), *V. fortis* (4) and *V. tapetis* (3).

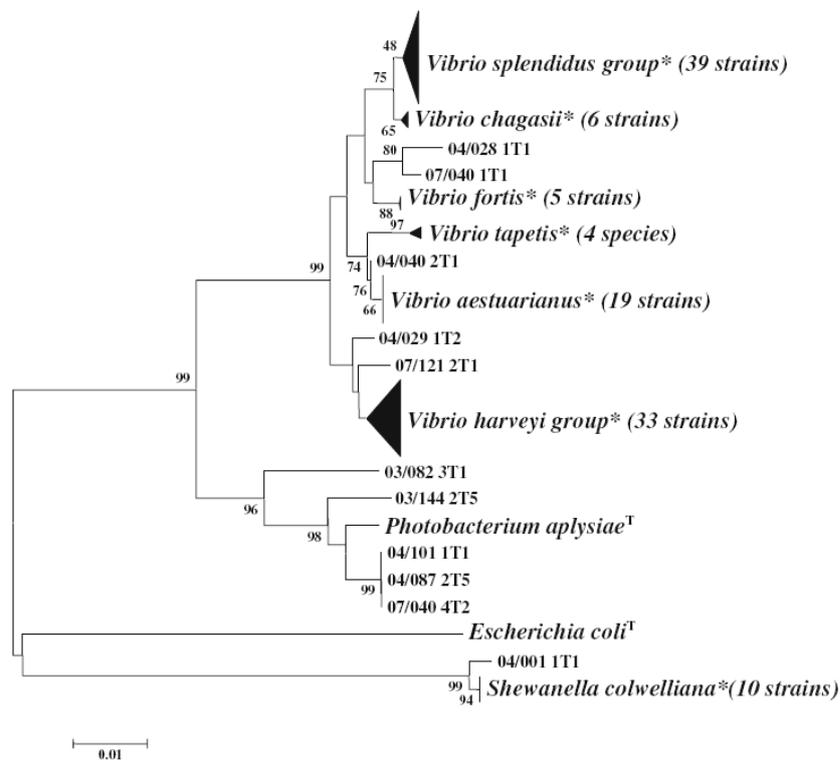


Figure 1: Phylogenetic tree of partial 16S rDNA from bacteria isolated from 4 cultivated mollusc species (mainly *C. gigas*), collected in the context of mortalities (92 episodes), and *Vibrio* reference strains. A total of 652 gap-free sites were analysed. The evolutionary distances were computed using the Neighbour-Joining method. Bootstrap values (1000 replicates) greater than 50 % are indicated.* denotes a reference type strain that was included to identify the strains of this study.

To define the taxonomic affiliation of *V. splendidus*-related strains, a phylogenetic analysis was performed on the *gyrB* gene (Fig. 2) using 15 representative strains obtained in Fig. 1. Twelve of these strains were affiliated to the *V. splendidus* type strain, one (05/013 2T1) to the *V. crassostreae* type strain and one (04/112 1T1 strain) was found in the cluster composed of *V. lentus*, *V. tasmaniensis*, *V. kanaloae* and *V. pomeroyi* type strains. An additional strain (03/126 1T2) was found not to be affiliated to any *Vibrio* species yet described.

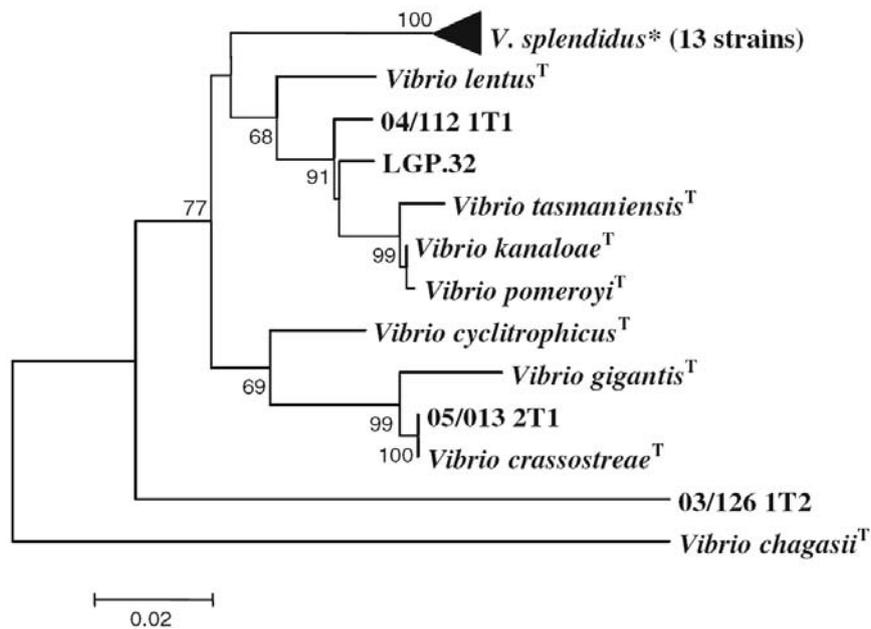


Figure 2: Phylogenetic tree of partial *gyrB* gene from bacteria isolated from 3 bivalve mollusc species collected in a context of mortalities (19 episodes) and reference *Vibrio* strains, based on the analysis of 700 gap-free sites. The evolutionary distances were computed using Neighbour-Joining method and Kimura 2 parameters model. Bootstrap values (1000 replicates) greater than 50 % are indicated. * denotes a reference type strain that was included to identify the strains of this study.

Strain distribution

A total of 115 strains were isolated from *C. gigas* collected during 73 mortality episodes between 2003 and 2007, mainly during the hot season between May and October (Table 1).

Table 1: Number of bacterial strains isolated from *C. gigas* during 73 mortality episodes between 2004 and 2007 and distribution according to production type (private farms or experimental facilities), rearing practices (open sea tidal areas or indoor facilities), age of animals (larvae and young spat of less 3 cm of size were treated in pools for bacteriological analysis, juveniles of more than 3 cm of size and adults were treated individually using haemolymph, see Material and Methods), season (the cold season is between October and March) and bacterial species. More frequently encountered bacterial strains (>19%) are represented in bold type.

	Private farms						Experimental facilities	
	Tidal areas	Indoor facilities	Larvae and young spat	Juveniles and adults	Cold season	Warm season	Larvae and young spat	Juveniles and adults
Number of total bacterial strains and percentage representation	48	15	29	34	5	58	32	20
<i>Vibrio splendidus</i> group	16 (33%)	4 (27%)	8 (27%)	12 (25%)	3	17 (29%)	6 (19%)	6 (30%)
<i>V. aestuarianus</i>	11 (23%)	1	0	12 (35%)	1	11 (19%)	2	11 (55%)
<i>V. harveyi</i> group	6 (13%)	5 (33%)	7 (24%)	4 (12%)		11 (19%)	16 (50%)	0
<i>Shewanella colwelliana</i>	5 (10%)	3 (20%)	5 (17%)	3	1	7 (12%)	1	1
<i>V. chagasii</i>	0	2 (13%)	2	0	0	2	2	0
<i>V. fortis</i>	3	0	2	1	0	3	2	0
<i>V. tapetis</i>	3	0	2	1	0	3	0	0
Non identified species	4	0	3	1	0	4	3	2 (10%)

More frequently encountered bacterial strains (>19%) are represented in bold type

Among these, 63 strains (isolated from 39 mortality episodes) originated from 21 private farms in different localities and 52 strains (isolated from 34 mortality episodes) from experimental facilities of IFREMER in Bouin (Vendée) and La Tremblade (Charente Maritime) (Fig. 3). The strains encountered most frequently belonged to the *V. splendidus* group, *V. harveyi* group or *V. aestuarianus*: representing 32/115 (28 %), 27/115 (23 %) and 25/115 (22 %) of the total strains, respectively. Analysis of the distribution of the strains obtained from private farms along French coasts, according to the type of production structure, revealed that *V. splendidus* was detected in both tidal areas and indoor facilities at 33 % and 27 %, respectively. In contrast, *V. aestuarianus* was mainly found in open sea intertidal areas (11 over 12 strains). A discrepancy between these two *Vibrio* species was also noticed according to oyster age. In contrast to *V. splendidus*, which was found in oysters of all ages, *V. aestuarianus* strains were only found in juvenile or adult animals. The same tendency was seen in the IFREMER experimental facilities (11 over 13 strains). Study of the geographical distribution of *V. splendidus*-related bacterial strains revealed that these strains were present all along the Atlantic, English Channel and Mediterranean coasts of France (data not shown). Surprisingly, *V. aestuarianus* was present along the whole Atlantic coast and English Channel but was not detected in oysters cultivated on the Mediterranean. Among the other bacterial species most frequently detected in *C. gigas*, 11 *V. harveyi*-related and 8 *S. colwelliana* strains were isolated from oysters sampled on private farms, mainly from indoor facilities (hatcheries and nurseries); 33 % and 20 % detection frequencies were shown for these species, respectively, mainly found to be associated with mortality events affecting earlier life stages (24 % and 17 % respectively). *Vibrio harveyi*-related strains were also

frequently detected in young animals bred in the IFREMER experimental facilities (50 %), in contrast to *S. colwelliana*, for which only one strain was isolated out of 32. Interestingly, only two *V. harveyi* strains were detected between 2003 and 2005, whereas 25 new ones were isolated in 2007. Reports of *V. harveyi* strains were confined to three open sea rearing sites on the Mediterranean coast and Arcachon Bay (6 strains), two private hatcheries or nurseries (5 strains) and the IFREMER experimental facilities (16 strains). Other bacterial species detected less frequently were *V. chagasii*, *V. fortis* and *V. tapetis*.

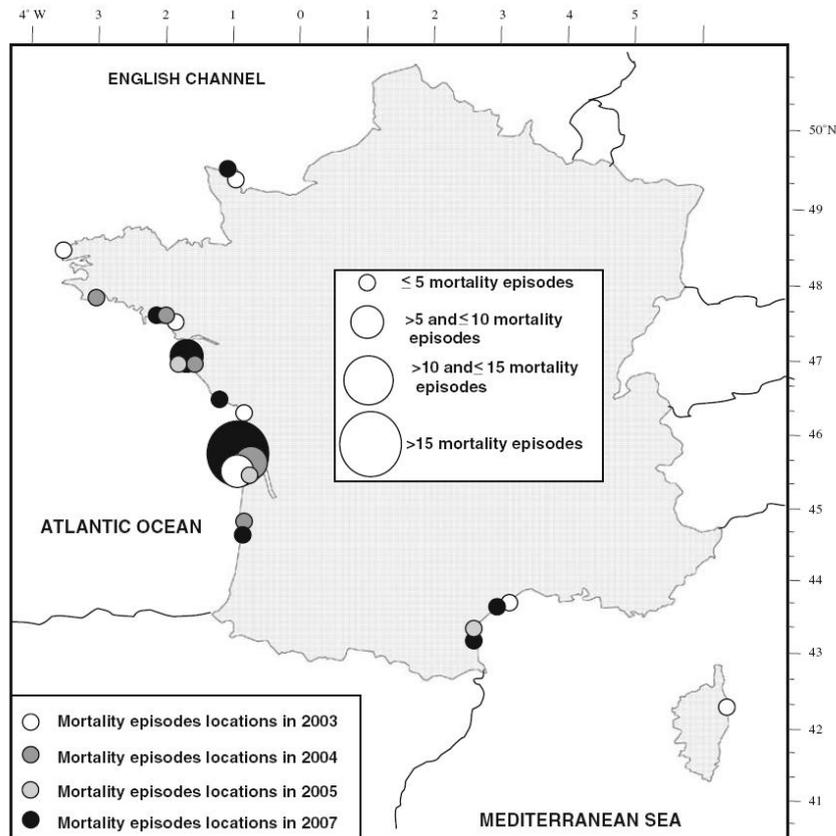


Figure 3 : Distribution of the 73 *C. gigas* mortality episodes between 2003 and 2007 in both private farms and Ifremer experimental facilities.

Another 32 bacterial strains were isolated from other mollusc species of economic interest in the context of 19 mortality events that occurred between 2003 and 2007 in Brittany, Normandy and Vendée. The most frequently detected bacterial species were *V. splendidus* and *S. colwelliana* (Table 2) found in scallops *Pecten maximus*, clams *Ruditapes philippinarum* and abalones *Haliotis tuberculata*, representing 62 % of total strains. Furthermore, *H. tuberculata* was frequently found to be infected with *V. harveyi* strains (6 out of 14).

Considering all the tissue samples analysed, some cases of co-infection by multiple bacterial species were noted. In particular, the presence of both *V. aestuarianus* and *V. splendidus* strains in the same sample was found 9 times among the 92 batches of animals analysed.

Table 2: Classification of bacterial strains isolated from scallops *Pecten maximus*, clams *Ruditapes philippinarum* and abalones *Haliotis tuberculata* according to more frequently detected bacterial species.

	Number of batches collected during mortality episodes	Number of strains isolated	Number of bacterial strains identified			
			<i>V. splendidus</i>	<i>V. tapetis</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>Shewanella colwelliana</i>
<i>Pecten maximus</i>	3	6	3	1	0	1
<i>Ruditapes philippinarum</i>	5	12	7	0	0	3
<i>Haliotis tuberculata</i>	11	14	4	0	6	2

Strain screening for virulence in *C. gigas* and metalloprotease activity

Several strains were selected from the more representative phylogenetic clades found in this study, corresponding to bacteria isolated during mortality events in four cultivated bivalve molluscs (Table 3): 14 strains belonged to the *V. splendidus* group, 9 to the *V. harveyi* group, 10 *V. aestuarianus* strains and 5 *S. colwelliana* strains. *Vibrio splendidus*-related strains were mainly those typed by the *gyrB* phylogenetic approach, whereas strains related to other well represented phylogenetic clades were selected arbitrarily from our bacteria collection. All tested *V. aestuarianus* and *V. harveyi* strains were found virulent by experimental injection of oysters with live bacteria whereas *S. colwelliana* strains were mainly avirulent, except for one strain (07/082 T2). Virulence was variable among *V. splendidus*-related strains. In particular, 4 field isolates plus one *V. tasmaniensis* type strain were found to be non-pathogenic. The peak of mortality induced by virulent strains was generally seen between the first and second day of infection challenge for *V. splendidus*-related strains, between day 2 and day 3 for *V. aestuarianus* strains and in the first 20 hours post challenge for *V. harveyi* strains.

Table 3: Characteristics of field isolates and *Vibrio* reference strains used in this study for the screening of strain virulence and proteolytic activity. Virulence of bacterial strains was evaluated by experimental infection of apparently healthy oyster spat. Column 1: Highly virulent strains, denoted “++”, were defined by cumulative mortalities up to 60 % after a seven day post injection survey. Avirulent strains, denoted “–”, exhibited cumulative mortalities below 20 % after a seven day post injection survey. Bacterial strains displaying intermediate virulence are denoted “+”. Column 2: Indicates the day where the peak of mortality was recorded. Metalloprotease activity was calculated as the difference between azocaseinase activity obtained in the absence or presence of phenanthroline. Positive metalloprotease activity was defined beyond the threshold of 50 u/ml. For the majority of bacterial strains, metalloprotease activity was sensitive to phenanthroline treatment (more than 90% of inhibition). Nevertheless, metalloprotease activity ⁽¹⁾ of some particular strains was partially inactivated (between 50 % and 70% according to bacterial strain).

<i>Vibrio</i> species	Strain denomination	Source and context of isolation	Virulence		Protease activity
<i>V. splendidus</i> group			1	2	Metalloproteinase-like
<i>V. lentus</i>	04/112 1T1	<i>C. gigas</i> oyster spat, 2004 mortality episode(m.e) in an indoor breeding structure, Charente-Maritime (CM), France	++	J2	+ (61 µ/ml)
<i>V. lentus</i>	LGP32	<i>C. gigas</i> oyster spat, 2002 m.e. in Ifremer experimental facilities, La Tremblade, CM, France, Gay et al. 2002	+	J2	++ (120 µ/ml)
<i>V. splendidus</i>	03/028 6T1	<i>C. gigas</i> oyster spat, 2003 m.e in an indoor breeding structure, CM, France	-		+ (64 µ/ml)
<i>V. splendidus</i>	03/013 4T1	<i>R. philippinarum</i> clam spat, 2003 m.e in an indoor breeding structure, Bouin, Vendée, France	+	J3	++ (156 µ/ml) ⁽¹⁾
<i>V. crassostreae</i>	05/013 2T1	<i>C. gigas</i> oyster spat, 2005 m.e. in an open sea rearing farm, Leucate lagoon, Southern France	-		++ (141 µ/ml)
<i>V. splendidus</i>	05/103 2T1	<i>P. maximus</i> scallop spat, 2005 m.e. in an open sea rearing farm, Morlaix Bay, Brittany , France	++	J1	+++ (205 µ/ml)
<i>V. splendidus</i>	03/126 1T2	<i>C. gigas</i> oyster spat, 2003 m.e. in an open sea rearing farm, Urbino lagoon, Corsica , Southern France	+	J5	+++ (264 µ/ml)
<i>V. splendidus</i>	04/113 1T1	<i>C. gigas</i> oyster spat, 2004 m.e. in an indoor breeding structure, CM, France	++	J1	++ (149 µ/ml) ⁽¹⁾
<i>V. splendidus</i>	03/024 5T6	<i>R. philippinarum</i> clam adult, 2003 m.e. in an open sea rearing farm, Rance, Brittany , France	++	J1	+++ (252 µ/ml)
<i>V. splendidus</i>	03/025 1T1	<i>R. philippinarum</i> clam adult, 2003 m.e. in an open sea rearing farm, Rance, Brittany , France	++	J1	+++ (253 µ/ml)
<i>V. splendidus</i>	03/011 1T4	<i>C. gigas</i> oyster spat, 2003 m.e. in an indoor breeding structure, CM, France	-		- (0 µ/ml)
<i>V. splendidus</i>	07/040 2T2	<i>C. gigas</i> oyster spat, 2007 m.e. in an open sea rearing farm, Thau lagoon, Southern France	++	J2	++ (123 µ/ml)
<i>V. splendidus</i>	07/111 T1	<i>C. gigas</i> oyster spat, 2007 m.e. in an indoor breeding structure, CM, France	-		++ (127 µ/ml)
<i>V. tasmaniensis</i>	LMG20012	Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i> L.), Tasmania, Australia, Thompson et al. 2003	-		- (0 µ/ml)
<i>V. harveyi</i> group					
<i>V. harveyi</i>	07/108 1T1	<i>C. gigas</i> oyster spat, 2007 m.e. in an indoor breeding structure, CM, France	++	<20 h	++++ (300 u/ml)
<i>V. harveyi</i>	07/115 T2	<i>C. gigas</i> oyster spat, 2007 m.e. in an indoor breeding structure, CM, France	++	<20 h	++ (173 u/ml) ⁽¹⁾
<i>V. harveyi</i>	07/116 1T1	<i>C. gigas</i> oyster spat, 2007 m.e. in an indoor breeding structure, CM, France	++	<20 h	++ (183 u/ml) ⁽¹⁾
<i>V. harveyi</i>	07/118 T2	<i>C. gigas</i> oyster spat, 2007 m.e. in an indoor breeding structure, CM, France	++	<20 h	+++ (204 u/ml) ⁽¹⁾
<i>V. harveyi</i>	07/119 1T1	<i>C. gigas</i> oyster spat, 2007 m.e. in an indoor breeding structure, CM, France	++	<20 h	++ (116 u/ml)
<i>V. harveyi</i>	07/121 1T1	<i>C. gigas</i> oyster spat, 2007 m.e. in an indoor breeding structure, CM, France	++	<20 h	++ (185 u/ml) ⁽¹⁾
<i>V. harveyi</i>	03/082 2T1	<i>C. gigas</i> oyster spat, 2003 m.e. in an open sea rearing farm, Thau lagoon, Southern France	+	J1	- (3 u/ml)
<i>V. harveyi</i>	04/002 1T2	<i>H. tuberculata</i> spat, 2004 m.e. in a hatchery, Normandy, France	++	<20 h	++ (137 u/ml)
<i>V. harveyi</i>	04/107 1T1	<i>H. tuberculata</i> juvenile, 2004 m.e. in an indoor breeding structure, Blainville-sur-Mer, Normandy, France	++	J2	- (12 u/ml)
<i>V. aestuarianus</i>	05/091 1T1	<i>C. gigas</i> oyster spat, 2005 m.e. in an indoor breeding structure, CM, France, Saulnier et al, 2009	++	J2	+ (85 u/ml)
<i>V. aestuarianus</i>	04/021 3T1	<i>C. gigas</i> oyster spat, 2004 m.e. in an indoor breeding structure, CM, France, Saulnier et al, 2009	++	J3	++ (185 u/ml)
<i>V. aestuarianus</i>	04/047 3T1	<i>C. gigas</i> oyster spat, 2004 m.e. in an indoor breeding structure, CM, France, Saulnier et al, 2009	++	J5	+++ (209 u/ml)
<i>V. aestuarianus</i>	03/011 1T1	<i>C. gigas</i> oyster spat, 2003 m.e. in an indoor breeding structure, CM, France, Saulnier et al, 2009	++	J3	++ (120 u/ml))
<i>V. aestuarianus</i>	03/146 2T1	<i>C. gigas</i> oyster adult, 2003 m.e. in an open sea rearing farm, Angoulin, CM, France, Saulnier et al, 2009	++	J3	++ (172 u/ml)

Table 3 (continued)

<i>Vibrio</i> species	Strain denomination	Source and context of isolation	Virulence	Protease activity
<i>V. aestuarianus</i>	04/055 2T3	<i>C. gigas</i> oyster adult, 2004 m.e. in an open sea rearing farm, Arcachon Bay, Gironde, France, Saulnier et al, 2009	++ J3	+ (96 u/ml)
<i>V. aestuarianus</i>	07/083 1T1	<i>C. gigas</i> oyster adult, 2007 m.e. in an open sea rearing farm, Marennes-Oléron Bay, CM, France, Saulnier et al, 2009	++ J3	++ (189 u/ml)
<i>V. aestuarianus</i>	07/046 1T1	<i>C. gigas</i> oyster adult, 2007 m.e. in an open sea rearing farm, Olonne, Vendée, France, Saulnier et al, 2009	++ J2	++ (183 u/ml)
<i>V. aestuarianus</i>	07/080 1T2	<i>C. gigas</i> oyster adult, 2007 m.e. in an open sea rearing farm, Marennes-Oléron Bay, CM, France, Saulnier et al, 2009	++ J2	+ (83 u/ml)
<i>V. aestuarianus</i>	02/041	<i>C. gigas</i> oyster adult, 2002 m.e. in a hatchery, Argenton, Finistère, France, Garnier et al. 2007	++ J2	++ (173 u/ml)
<i>S. colwelliana</i>	07/050 1T2	<i>C. gigas</i> oyster spat, 2007 m.e. in an open sea rearing farm, Bay of Morbihan, Brittany, France	-	- (7 u/ml)
<i>S. colwelliana</i>	07/079 2T2	<i>C. gigas</i> oyster adult, 2007 m.e. in an open sea rearing farm, Marennes-Oléron Bay, CM, France	-	- (12 u/ml)
<i>S. colwelliana</i>	07/082 T2	<i>C. gigas</i> oyster spat, 2007 m.e. in a hatchery, Bourgneuf Bay, Vendée, France	+ J2	- (8 u/ml)
<i>S. colwelliana</i>	07/085 1T1	<i>C. gigas</i> oyster spat, 2007 m.e. in a hatchery, Bourgneuf Bay, Vendée, France	-	- (23 u/ml)
<i>S. colwelliana</i>	07/086 1T1	<i>C. gigas</i> oyster spat, 2007 m.e. in a hatchery, Bourgneuf Bay, Vendée, France	-	- (32 u/ml)

Metalloprotease-like activities of culture supernatants and virulence status were compared for each of the tested strains, whatever their species, and a contingency table was built (table 4): 76 % of strains displayed metalloprotease-like activities or virulence capacities, whereas 24 % were found negative for both tests and a correlation was revealed. Concordant results were obtained for 32 strains out of 38 (84 %), with 26 and 6 strains found positive and negative for the two tests, respectively. Divergent results between the two tests were obtained for *V. splendidus*-related strains (3 strains), *V. harveyi*-related strains (2 strains) and *S. colwelliana* (1 strain), but not for *V. aestuarianus* strains. Finally, 90 % of metalloprotease positive strains were found to be virulent.

Table 4: Contingency table showing the number of bacterial strains characterized according their ability to produce metalloprotease-like enzyme or not in culture supernatants, given with their virulence status evaluated by experimental infection (See table 3).

	Metalloprotease-like activity		
	+	-	
Virulence status	+	26 (90%)	76%
	-	3 (10%)	24%
		76%	24%

Synergistic virulence effect of *Vibrio* co-infection

Following the evidence for cases of natural co-infection by *V. aestuarianus* and *V. splendidus*, well characterized LGP32 and 02/041 strains were injected together to study their pathogenicity and compare it with injection of single strain bacterial injection at the same dose (Fig. 4). The use of a mixture of LGP32 and 02/041 strains at a dose of 5×10^7 CFU oyster⁻¹ for each strain gave a mortality rate of 88.9 %, which was higher than the mortality rate obtained when bacteria were injected alone at the same dose i.e. 10^8 CFU oyster⁻¹ (60 and 53.3 %, respectively). Furthermore, lowering the injected dose of the LGP32 and 02/041 mixture by a factor of 10 or 100 resulted in lower but significant cumulative mortalities, with rates of 84.7 and 34.4 %, respectively, whereas a 1/100 dilution factor removed the pathogenicity of these strains when they were used individually (data not shown). Furthermore, whatever the bacteria used in experimental challenges, we verified with the plate counting method that haemolymph samples from some freshly dead oysters harboured dominant bacteria belonging to the same species as those injected, fulfilling one of the Koch's postulates (data not shown).

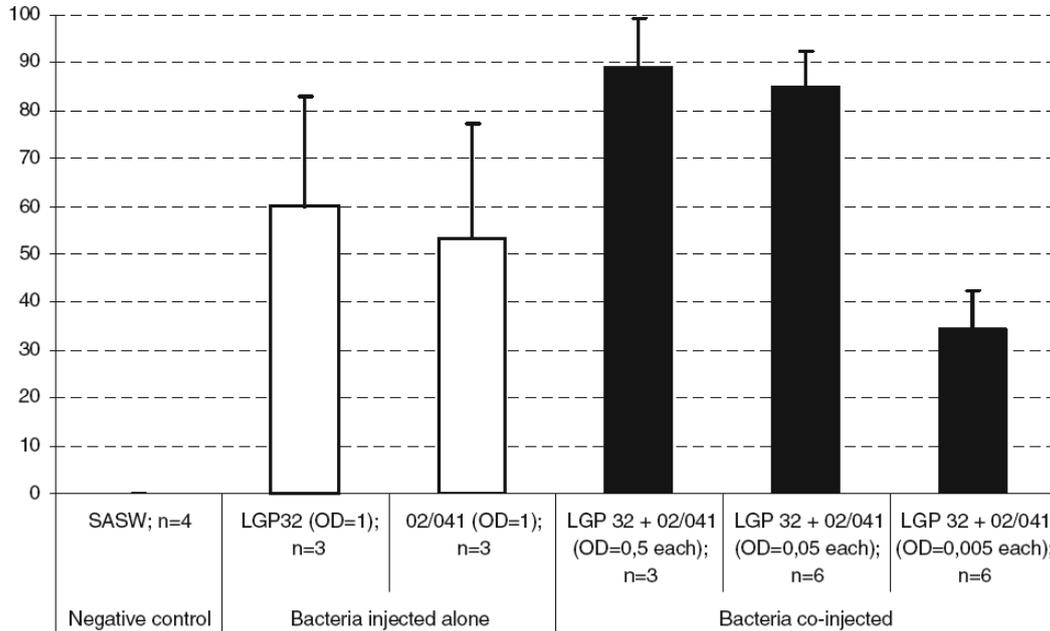


Figure 4 : Cumulative mortality rates (%) at day five post injection with bacterial strains. Strains LGP32 (*V. splendidus*) and 02/041 (*V. aestuarianus*) were injected individually using a bacterial suspension at OD=1. The same strains were injected as a mixture and at different doses. Sterile artificial seawater (SASW) was used as negative control. Fifteen to twenty injected oysters were placed in each aquarium. Symbol "n" indicates the number of aquaria or replicates; bars show standard deviations.

Discussion

Previous geographically and temporally limited bacteriological studies performed during summer mortality phenomena in Pacific *C. gigas* oysters reared in France have shown that two *Vibrio* species, *V. aestuarianus* and *V. splendidus*, are frequently, but not systematically, associated with summer mortality phenomenon with several strains demonstrated to be virulent for this oyster species in experimental infections [3, 25]. In the present study we performed a large-scale epidemiological survey to identify the bacteria abundant in four mollusc species (mainly Pacific oyster) cultivated in France during 92 mortality episodes between 2003 and 2007 and evaluate experimentally their virulence. Throughout this survey, histological analyses were also performed on 30 animals for each sample batch received, but no other important pathogenic agent was detected (data not shown).

Strong seasonality was observed in mortality episodes, as 68 out of the 73 in *C. gigas* grown in open sea sites occurred between May and September, with an onset in June (39/68 = 57 %) that coincided with the period of summer mortality phenomena. Incidence of *V. aestuarianus* and *V. splendidus* in oyster mortality outbreaks was confirmed, since a high frequency of detection (22 % and 28 %, respectively) was noted among the 115 identified strains. As observed in previous studies [33], isolated *V. splendidus* strains belong to a genetically complex polyphyletic group constituted by at least eight species [34]. Using *gyrB* as one of the more polymorphic housekeeping genes for phylogenetic analysis of this group, the majority of *V. splendidus*-related strains isolated (12 out of 15) were affiliated to the *V. splendidus* type strain. In contrast, isolated *V. aestuarianus* strains seemed to be genetically similar, with less than 1 % nucleotide variation in their 16S rDNA gene. Both *V. splendidus*-related and, especially, *V. aestuarianus* species were more frequently detected in oysters reared in the open sea than in indoor facilities of private farms (33 % and 23 % compared with 27 % and less than 5 %, respectively) suggesting that coastal waters harbour these two organisms naturally. Indeed, *V. splendidus*-related strains were shown to be the most abundant planktonic species among the *Vibrionaceae* [35]. The fact that *Vibrio aestuarianus* was more frequently (25 %) detected in oysters reared in IFREMER indoor experimental facilities suggests that infectiosity of these organisms may be favoured by zootechnical practices, such as the use of low and frequently thermo-regulated rearing water flow. However, we cannot exclude the possibility that these data arose from an improved reactivity in detection and bacteriological sampling during mortality episodes, due to the close proximity of oysters to the IFREMER laboratory. The observation of symptomatology (weakness of the adductor muscle) may also have been easier than in field-reared oysters.

Other more frequently detected bacteria species associated with *C. gigas* mortality events encompassed *V. harveyi* and *S. colwelliana*. Similar to the *V. splendidus* group, *V. harveyi* has been shown by a multilocus sequence typing approach to be constituted of at least 7 species displaying a

very high degree of both genetic and phenotypic similarity [36]. It seems relevant to note that in our study the number of *V. harveyi*-related strains associated with *C. gigas* mortality events rapidly increased in 2007, to 25 strains, whereas only two were isolated between 2003 and 2005. Further molecular typing studies are needed to assess the degree of similarity between these geographically distant isolates. In contrast, *Shewanella* spp. has never, to our knowledge, been associated with disease outbreaks in cultivated bivalve molluscs. In the present study, only one strain out of 5 was found to be moderately pathogenic for *C. gigas* oysters in experimental infections. This bacteria is reported to be a commensal in *O. edulis* [37] and *C. virginica* [38] oysters. Because *S. colwelliana* bacterial colonies isolated in this study display a similar macroscopic appearance to *V. splendidus*, and because cases of co-infection of samples by *S. colwelliana* and *V. splendidus*-related strains were frequently encountered (data not shown), we can hypothesize that we overestimated sample bacterial load due to *S. colwelliana* by erroneously considering that this bacterium could be dominant.

The association of microorganisms with animal tissue can be commensal, mutualistic, pathogenic or coincidental, due to the filter feeding behaviour of molluscs. As a consequence, many bacterial species and genera (mainly *Vibrio*) have been described as components of the bacterial flora naturally harboured by molluscs [39-43]. Nevertheless, they may act as opportunistic pathogens under adverse circumstances or in immuno-compromised animals. In our experience, the cultivable bacterial flora of healthy *C. gigas* oysters ranges from 10^2 to 10^4 CFU/mg tissue according to the origin of the oysters and the season, with a tendency towards higher bacterial load in oyster tissues when seawater temperature is higher (> 19 °C). In the present study, we considered that all bacterial isolates found dominant by the plate counting method were potentially pathogenic and not of environmental origin because they were isolated in a context of mortalities and found to be present at abnormal concentrations ($>10^4$ CFU/mg), mainly in tissue samples originating from diseased animals. Nevertheless, we cannot exclude the possibility that less abundant non-dominant bacteria could be also pathogenic and could be the primary etiological agent of disease. These bacteria may be also counter-selected by culture conditions or be uncultivable on the synthetic medium used.

Using standardized experimental challenges on healthy oysters, as described by Gay et al. [25] and Labreuche et al. [44, 45], we evaluated the potential virulence status of some strains belonging to the more frequently occurring species in our collection. Most *V. splendidus* but all *V. harveyi*-related and *V. aestuarianus* strains tested were found virulent. Using two extensively studied pathogenic strains, LGP32 [4] and 01/042 [3], described by the same authors as one of the most virulent strains for *C. gigas* oyster and related to *V. splendidus* and *V. aestuarianus*, respectively, a synergistic effect was observed between these two strains when they were injected simultaneously. Such a phenomenon had already been observed in *C. gigas* oysters experimentally infected with two genetically close strains related to *V. splendidus* [3, 5]. These results suggest that some not yet identified strain-specific virulence mechanisms are involved in pathogenicity expression. Because natural cases of co-infection

by these two species-specific pathogens have been observed in our study, such synergistic virulence effects between two different *Vibrio* species would be expected to occur in some natural *C. gigas* disease outbreaks.

Although *V. splendidus* strains have already been found to be associated with mortality events in *P. maximus* [26, 46] and carpet shell clam *Ruditapes decussatus* [47] this is the first time, to our knowledge, that *V. splendidus* has been found to be associated with the mortality of clam *Ruditapes philippinarum* or abalone *Haliotis tuberculata*. Even though further studies are needed to demonstrate their role in disease outbreaks of these other mollusc species, it is noticeable that several *V. splendidus* strains isolated from *R. philippinarum* were found to be virulent for *C. gigas* in experimental infection, suggesting that a common agent may infect different mollusc species. Similarly, considering *V. harveyi*, a well known pathogen of cultivated *Haliotis tuberculata* in France [48, 49], two strains isolated in this study exhibited a pathogenic effect on *C. gigas* when evaluated by experimental infection. In contrast to other *V. splendidus* or *V. harveyi* strains studied, which seemed to be ubiquitous, those identified as *V. aestuarianus* appear to only induce disease in *C. gigas*.

Finally, a high level of concordant results between azocaseinase activities and virulence of strains were obtained in this study. Azocaseinase activity was assumed to be due to a metalloprotease-like enzyme following the results of zinc-dependant chelators, such as phenanthroline or EGTA inhibitory treatments (data not shown), with up to 90 % inhibition for most strains and partial inhibition for a limited number of strains. Despite this correlation, metalloprotease appeared not to be the only virulence determinant of virulent strains, because 3 strains were found to be devoid of this enzyme, though they were in a minority compared with the 29 tested-virulent strains. Conversely, 3 among 9 avirulent strains exhibited metalloprotease activity, suggesting that these bacteria were unable to produce this enzyme *in vivo*. In any case, the role of metalloprotease in pathogenesis of vibriosis in different host species has been explored by several *in vitro* approaches. Several host substrates and culture conditions for efficient metalloprotease production have been identified that could be involved in invasion process [19, 32, 50-54]. In contrast, few approaches have been conducted *in vivo* that aim to demonstrate the role of metalloproteases in virulence induced by *Vibrio* infection. This could be due to the lack of mutant strains, lack of tools to quantify metalloprotease production or its expression by pathogens during infection, or the absence of appropriate infection models. The small number of virulence studies that have been realized using mutants deficient in metalloprotease gave mitigated results and conclusions. Infecting fish with wild or metalloprotease-mutated pathogenic strains of *V. anguillarum*, Milton et al. [55] and Denkin and Nelson [51] noticed contrasted virulence profiles according to strains, infection route and infection model. For example, the NB10 metalloprotease-deficient mutant was found to be completely avirulent when injected intraperitoneally or by anal intubation into Atlantic salmon [51], whereas the same mutant exhibited attenuated virulence when

administered to rainbow trout by intraperitoneal injection or immersion challenge [55]. Furthermore, metalloprotease mutant M99 derived from another virulent *Vibrio anguillarum* strain was found to be as virulent as the wild strain when injected intraperitoneally and to display attenuated virulence when administered by anal intubation [51]. In *Vibrio sp.* strains pathogenic to *C. gigas* oysters, high homology between amino acid sequences deduced from metalloprotease genes has been noticed, suggesting a similar role in pathogenesis. Those from *V. splendidus* LGP32 and *Vibrio tubiashii* RE22 strains (named *vsm* and *Vtpa* with GenBank accession numbers ACD87449 and CAV18407 respectively) displayed 75 % identity and 88 % similarity. Similarly, whole genome sequencing comparisons between LGP32 and two other geographically distant virulent strains related to *V. splendidus* (Med222 and 12B01), showed that genes encoding metalloprotease shared more than 98 % identity and that *vsm* was localised on chromosome 1 in a region (position 1 673 221- 1 365 498) devoid of genome plasticity [21, 56]. The predicted product of *vsm* gene product exhibits 67 % identity and 81 % similarity with *V. aestuarianus* strain 01/032 (AAU04777) or with *V. anguillarum* strain NB10 (AAA27517). The deletion of *vsm* and *Vtpa* genes from LGP32 and RE25 strains was shown to decrease the toxicity of extracellular products towards *C. gigas* spat and larvae [21, 24, 56]. Furthermore, the metalloprotease activity and toxicity of *vsm* mutant were restored by ectopic complementation, suggesting that metalloprotease is important in its pathogenicity to oyster. Nevertheless, the fact that the *vsm* mutant displays an equal virulence to the parental strain when injected intramuscularly to oyster [21] suggests that this metalloprotease may interact with other virulence factors that still need to be identified and/or that the experimental infection model used here, via an invasive route, is inappropriate.

To our knowledge, this is the first time that a correlation has been reported between *C. gigas* pathogenic bacterial strains related to *V. aestuarianus*, or polyphyletic groups of *V. splendidus* and *V. harveyi*, and the ability of these bacteria to produce metalloprotease in culture supernatants following large-scale strain screening from an epidemiological study. Because *V. harveyi* strains were recently isolated from *C. gigas* oyster mortality events occurring in France (mainly in 2007), further epidemiological studies and molecular typing methods are needed to gain an idea of whether a new *C. gigas* pathogen has emerged and to identify strains related to this complex polyphyletic group to the species level. Bacterial metalloprotease activities appear in this study as a common feature of pathogenic bacteria strains associated with mortality events of *C. gigas* reared in France, suggesting that this phenotypic test could be useful for the evaluation of virulence in bacterial strains associated with such mortality episodes. Indeed, experimental infection trials to evaluate virulence potential of bacterial strains are time consuming, as they require at least five consecutive working days, as well as dedicated experimental facilities, including a system for treating of seawater effluents. In contrast, measurement of metalloprotease activities requires less time (estimated at a total of one day of work for the treatment of approximately thirty bacterial strains). Few studies had been previously conducted

in vivo to demonstrate the involvement of metalloproteases in virulence during *Vibrio* infection, compared with the number of *in vitro* studies. There is, therefore, a huge need to develop molecular and biochemical tools to study the encoding gene(s) at both the expression and translation level, and to identify host and environmental factors modulating the production of metalloprotease by both pathogenic and presumed commensal bacterial strains. For this purpose, the use of a non-invasive experimental model for infection of oysters with pathogenic *Vibrio* will be very useful and will allow future studying of the interactions between metalloprotease and other virulence factors that still need to be identified.

Acknowledgments

We thank Helen McCombie for her help with English editing.

References

1. Fleury PG, Goyard E, Mazurie J, Claude S, Bouget JF, Langlade A, Le Cogucic Y (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
2. 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. *Journal of Microbiological Methods* 77: 191-197
3. Garnier M, Labreuche Y, Garcia C, Robert M, Nicolas JL (2007) Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microbial Ecology* 53: 187-196
4. Le Roux F, Gay M, Lambert C, Waechter M, Poubalanne S, Chollet B, Nicolas JL, Berthe F (2002) Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic Living Resources* 15: 251-258
5. Gay M, Renault T, Pons AM, Le Roux F (2004) Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Diseases of Aquatic Organisms* 62: 65-74
6. Soletchnik P, Ropert M, Mazurie J, Fleury PG, Le Coz F (2007) Relationships between oyster mortality patterns and environmental data from monitoring databases along the coasts of France. *Aquaculture* 271: 384-400
7. Gouletquer 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). *Counc Meet of the Int Counc for the Exploration of the Sea, Cascais (Portugal)*, 16-19 Sep 1998: 20p.
8. Samain JF, McCombie H (2008) Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *The Morest Project*: 379p.
9. Tubiash HS, Chanley PE, Leifson E (1965) Bacillary Necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *Journal of Bacteriology* 90: 1036-1044
10. Estes R, Friedman C, Elston R, Herwig R (2004) Pathogenicity testing of shellfish hatchery bacterial isolates on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Diseases of aquatic organisms* 58: 223-230
11. Elston RA, Hasegawa H, Humphrey KL, Polyak IK (2008) Re-emergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: severity, environmental drivers, geographic extent and management. *Diseases of Aquatic Organisms* 82: 119-134
12. Inamura H, Nakai T, Muroga K (1985) An extracellular protease produced by *Vibrio anguillarum*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 51: 1915-1920

13. Lee KK, Liu PC, Chuang WH (2002) Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish. *Marine Biotechnology* 4: 267-277
14. Lee KK, Chen YL, Liu PC (1999) Hemostasis of Tiger prawn *Penaeus monodon* affected by *Vibrio harveyi*, extracellular products, and a toxic cysteine protease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 25: 180-192
15. Lee KK, Yu SR, Liu PC (1997) Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Current Microbiology* 34: 110-117
16. Nottage AS, Birkbeck TH (1987) Production of proteinase during experimental infection of *Ostrea edulis* L. larvae with *Vibrio alginolyticus* NCMB 1339 and the antigenic relationship between proteinases produced by marine vibrios pathogenic for fish and shellfish. *Journal of Fish Diseases* 10: 265-273
17. Travis J, Potempa J, Maeda H (1995) Are bacterial proteinases pathogenic factors? *Trends in Microbiology* 3: 405-407
18. Hase CC, Finkelstein RA (1993) Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases. *Microbiological Reviews* 57: 823-837
19. Miyoshi SI, Shinoda S (2000) Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes and Infection* 2: 91-98
20. Labreuche Y, Soudant P, Goncalves M, Lambert C, Nicolas JL (2006) Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental & Comparative Immunology* 30: 367-379
21. Le Roux F, Binesse J, Saulnier D, Mazel D (2007) Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counterselectable suicide vector. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 777-784
22. Delston R, Kothary M, Shangraw K, Tall B (2003) Isolation and characterization of a zinc-containing metalloprotease expressed by *Vibrio tubiashii*. *Canadian Journal of Microbiology* 49: 525-529
23. Binesse J, Delsert C, Saulnier D, Champomier-Verges MC, Zagorec M, Munier-Lehmann H, Mazel D, Le Roux F (2008) The metalloprotease *Vsm* is the main toxic factor for *Vibrio splendidus* extracellular products. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 7108-7117
24. Hasegawa H, Lind EJ, Boin MA, Hase CC (2008) The extracellular metalloprotease of *Vibrio tubiashii* is a major virulence factor for Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 4101-4110
25. Gay M, Berthe FC, Le Roux F (2004) Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* 59: 49-56

26. Lambert C, Nicolas JL (1998) Specific inhibition of chemiluminescent activity by pathogenic vibrios in hemocytes of two marine bivalves: *Pecten maximus* and *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology* 71: 53-63
27. Yamamoto S, Harayama S (1995) PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1104-1109
28. Chun J, Lee JH, Jung Y, Kim M, Kim S, Kim BK, Lim YW (2007) EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2259-2261
29. Hall T (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98
30. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599
31. Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791
32. Teo JWP, Zhang LH, Poh CL (2003) Cloning and characterization of a metalloprotease from *Vibrio harveyi* strain AP6. *Gene* 303: 147
33. Le Roux F, Gay M, Lambert C, Nicolas JL, Gouy M, Berthe F (2004) Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences. *Diseases of Aquatic Organisms* 58: 143-150
34. Fauray N, Saulnier D, Thompson FL, Gay M, Swings J, Le Roux F (2004) *Vibrio crassostreae* sp. nov., isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 2137-2140
35. Thompson JR, Pacocha S, Pharino C, Klepac-Ceraj V, Hunt DE, Benoit J, Sarma-Rupavtarm R, Distel DL, Polz MF (2005) Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population. *Science* 307: 1311-1313
36. Sawabe T, Kita-Tsukamoto K, Thompson FL (2007) Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis. *Journal of Bacteriology* 189: 7932-7936
37. Guisande JA, Montes M, Farto R, Armada SP, Perez MJ, Nieto TP (2004) A set of tests for the phenotypic identification of culturable bacteria associated with Galician bivalve mollusc production. *Journal of Shellfish Research* 3: 599-609
38. Weiner RM, Segall AM, Colwell RR (1985) Characterization of a marine bacterium associated with *Crassostrea virginica* (the Eastern oyster). *Applied and Environmental Microbiology* 49: 83-90
39. Colwell RR, Liston J (1960) Microbiology of shellfish. Bacteriological study of the natural flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Applied Microbiology* 8: 104-109

40. Macián M, Garay E, González-Candelas F, Pujalte M, Aznar R (2000) Ribotyping of *Vibrio* populations associated with cultured oysters (*Ostrea edulis*). *Systematic and Applied Microbiology* 23: 409-417
41. Olafsen JA, Mikkelsen HV, Giæver HM, Høvik Hansen G (1993) Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 1848-1854
42. Ortigosa M, Garay E, Pujalte MJ (1994) Numerical taxonomy of *Vibrionaceae* isolated from oysters and seawater along an annual cycle. *Systematic and Applied Microbiology* 17: 216-225
43. Pujalte MJ, Ortigosa M, Macián MC, Garay E (1999) Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater. *International microbiology* 2: 259-266
44. Labreuche Y (2006) Caractérisation de la virulence d'une souche de *Vibrio aestuarianus*, pathogène de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. In: Editor (ed.)^(eds.) Book Caractérisation de la virulence d'une souche de *Vibrio aestuarianus*, pathogène de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, vol. PhD Thesis. Université de Bretagne Occidentale, City, pp. 277.
45. Labreuche Y, Lambert C, Soudant P, Boulo V, Huvet A, Nicolas JL (2006) Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes and Infection* 8: 2715-2724
46. Nicolas JL, Corre S, Gauthier G, Robert R, Ansquer D (1996) Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Diseases of Aquatic Organisms* 27: 67-76
47. Gomez-Leon J, Villamil L, Lemos ML, Novoa B, Figueras A (2005) Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Appl Environ Microbiol* 71: 98-104
48. Travers MA, Le Goic N, Huchette S, Koken M, Paillard C (2008) Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish & Shellfish Immunology* 25: 800-808
49. Nicolas JL, Basuyaux O, Mazurié J, Thébault A (2002) *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Diseases of Aquatic Organisms* 50: 35-43
50. Chang AK, Kim HY, Park JE, Acharya P, Park IS, Yoon SM, You HJ, Hahm KS, Park JK, Lee JS (2005) *Vibrio vulnificus* secretes a broad-specificity metalloprotease capable of interfering with blood homeostasis through prothrombin activation and fibrinolysis. *Journal of Bacteriology* 187: 6909-6916
51. Denkin SM, Nelson DR (2004) Regulation of *Vibrio anguillarum* empA metalloprotease expression and its role in virulence. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4193-4204
52. Takahashi KG, Nakamura A, Mori K (2000) Inhibitory effects of ovoglobulins on bacillary necrosis in larvae of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology* 75: 212-217

53. Watanabe H, Miyoshi SI, Kawase T, Tomochika KI, Shinoda S (2004) High growing ability of *Vibrio vulnificus* biotype 1 is essential for production of a toxic metalloprotease causing systemic diseases in humans. *Microbial Pathogenesis* 36: 117-123
54. Kim C-M, Kang S-M, Jeon H-J, Shin S-H (2007) Production of *Vibrio vulnificus* metalloprotease VvpE begins during the early growth phase: Usefulness of gelatin-zymography. *Journal of Microbiological Methods* 70: 96-102
55. Milton DL, Norqvist A, Wolf-Watz H (1992) Cloning of a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology* 174: 7235-7244
56. Le Roux F, Mohamed Z, Chakroun N, Binesse J, Saulnier D, Bouchier C, Zidane N, Ma L, Rusniok C, Lajus A, Buchrieser C, Médigue C, Polz MF, Mazel D (2009) Genome sequence of *Vibrio splendidus*: an abundant planctonic marine species with a large genotypic diversity. *Environmental Microbiology*

Conclusion et perspectives

1. Diversité spécifique des agents pathogènes potentiellement impliqués dans les épisodes de mortalité estivale

Cette étude d'épidémiologie bactérienne souligne la complexité étiologique de ces phénomènes de mortalité estivale de *C. gigas*. En effet, elle rend compte d'une part de la diversité spécifique des groupes bactériens associés aux épisodes étudiés et d'autre part de la variabilité des associations bactériennes d'un épisode à l'autre, d'une année à l'autre et d'un type d'infrastructure à l'autre : on notera qu'outre les deux espèces communément identifiées dans des épisodes de mortalité estivale (*V. aestuarianus* et *V. splendidus*), une autre espèce de *Vibrio*, *V. harveyi* a été pour la première fois incriminée clairement dans de tels épisodes. Cette étude suggère donc l'existence d'interactions complexes entre différentes bactéries pathogènes. Par ailleurs, la plupart des souches étudiées sur un critère d'abondance ($>10^4$ CFU/mL d'échantillon) et isolées d'animaux apparemment malades, se sont avérées pathogènes pour *C. gigas* en infection expérimentale. Ainsi, l'ensemble de ces espèces apparaît comme potentiellement impliqué dans le déclenchement et/ou l'intensification des épisodes de mortalités estivales et leur rôle et leurs interactions restent à étudier. Il est également intéressant de noter la détection des deux groupes bactériens *V. splendidus* et *V. harveyi* chez les trois autres espèces de mollusques échantillonnés, *P. maximus*, *R. philippinarum* et *H. tuberculata*. Certaines de ces souches, associées pour la première fois à des épisodes de mortalité observés chez ces mollusques, se sont avérées pathogènes pour l'huître creuse en infection expérimentale. Ces résultats soulèvent de nombreuses questions quant au rôle de réservoir potentiel que peuvent constituer ces espèces de mollusques exploitées parfois à proximité des élevages d'huître creuse.

A ce niveau on peut conclure que l'étiologie des mortalités estivales peut impliquer potentiellement plusieurs espèces bactériennes variables selon les épisodes considérés, en association ou non. Cependant ces analyses sont basées sur des critères de cultivabilité et on ne peut exclure que d'autres espèces bactériennes non cultivables ou tout du moins faiblement représentées ne soient impliquées dans les mortalités estivales. Afin de s'affranchir du biais de cultivabilité des bactéries, il apparaît pertinent de développer dans le futur des approches d'écologie microbienne modernes telles que les approches de métagénomique, pour la caractérisation de la composition, la structure et de l'évolution de la flore endogène potentiellement pathogène associée à l'huître. Pour ces perspectives d'écologie microbienne, des techniques d'amplification par PCR du gène codant l'ARNr 16S, de clonage et de séquençage pour la recherche et l'identification taxonomique des bactéries totales de

l'hémolymphe d'huîtres creuses ont été mises au point et sont désormais disponibles. Ces outils de biologie moléculaire ont été validés au cours d'un travail visant la caractérisation de la flore normale présente dans l'hémolymphe d'un lot d'huîtres creuses et révélant une flore abondante et diversifiée. De façon inattendue, les quelques séquençages des inserts de colonies *E. coli* recombinantes ont permis d'identifier des espèces et genres bactériens déjà décrits par des approches de bactériologie classique reposant sur la cultivabilité des isolats bactériens (20 sur 23 analysés), remettant en cause l'idée couramment admise que la flore bactérienne cultivable issue d'organismes marins représente moins de 1% de la flore totale (Amann, *et al.*, 1995; Cottrell et Kirchman, 2000; Nocker, *et al.*, 2004; La Valley, *et al.*, 2009). Cette approche de type métagénomique a donc permis l'identification d'isolats bactériens déjà décrits par des approches de bactériologie classique appartenant aux genres *Pseudoalteromonas*, *Vibrio*, *Colwellia* et à la famille des Flavobactéries, mais également des isolats bactériens non détectés en bactériologie classique appartenant au groupe des Roseobacter. Ainsi, l'initiation de cette approche de type métagénomique ouvre des perspectives d'intérêt visant la caractérisation de la flore bactérienne normale de l'hémolymphe de l'huître creuse et de son évolution au cours d'épisodes de mortalité.

Enfin, de nombreux lots analysés au cours de cette période ont été diagnostiqués positifs à l'herpès virus OsHV-1. Au sein de plusieurs échantillons individuels, il a également été mis en évidence des co-détections herpès virus et vibrions. Ce type d'association herpès virus-vibrions, encore régulièrement retrouvé au cours des épisodes de mortalité observés entre 2007 et 2009, nécessiterait des études approfondies, par des approches *in situ* ou expérimentales, afin de documenter les interactions potentielles liant ces deux agents infectieux et leurs effet éventuels sur la physiologie de l'huître, le déclenchement des mortalités ou encore la pathogénèse. Au cours d'un travail réalisé en 2008 dans le but de renseigner le déterminisme génétique lié à la sensibilité des huîtres à une vibriose expérimentale (cf. chapitre 2), les familles, issues du programme de sélection divergente réalisée dans le cadre de MOREST et destinées à cette étude, ont subi à plusieurs reprises d'importantes mortalités. Grâce aux outils diagnostiques mis au point, le suivi régulier de ces différents agents infectieux, *V. splendidus*, *V. aestuarianus* et l'herpès virus OsHV-1 a pu être documenté au cours de ces mortalités. Les résultats de ces analyses montrent clairement l'implication concomitante de l'espèce *V. aestuarianus* et de l'herpès virus OsHV-1. Bien que non encore valorisée sous forme de publication, cette étude fait l'objet de la partie 2 intégrée dans le chapitre 2.

2. Implication dominante de *V. splendidus* et *V. aestuarianus* : développement d'outils de diagnostic et d'infection expérimentale

- Développement d'outils diagnostic de détection et de quantification indispensables

L'implication des groupes *V. splendidus* et *V. aestuarianus* dans les épisodes de mortalité de *C. gigas* apparaît majeure et corrobore les travaux précédemment cités réalisés entre 1997 et 2003 (Le Roux, *et al.*, 2002; Gay, *et al.*, 2004a; Garnier, *et al.*, 2007). Dans ce contexte, il est apparu primordial de mettre au point des outils de diagnostic spécifiques et sensibles, permettant une détection rapide des groupes dominants identifiés. Ainsi, des outils de diagnostic pour la détection spécifique de *V. splendidus* et *V. aestuarianus* par PCR classique et quantitative ont été développés au cours de cette thèse et transférés à la cellule analytique du LGP en charge de l'analyse des échantillons prélevés dans le cadre du réseau REPAMO. Même si ces outils ne permettent pas de discriminer les souches pathogènes des isolats non pathogènes, les différentes étapes des protocoles ont été optimisées et adaptées aux conditions d'analyses spécifiques de la cellule analytique du LGP en charge de l'analyse des lots de mollusques ayant subi une hausse de mortalité en France métropolitaine. Ainsi un diagnostic qualitatif par PCR en temps réel multiplex a été développé permettant d'identifier les souches bactériennes appartenant au groupe de *V. splendidus* ou à l'espèce *V. aestuarianus*. Ce test permet une identification en moins de deux heures de temps des colonies bactériennes isolées selon des techniques classiques de bactériologie et retrouvées majoritaires.

Suite à plusieurs sessions de formation et à la réalisation d'essais interlaboratoires débutées en 2008, ce test de diagnostic a été transféré à des laboratoires privés ou départementaux en vue de la création d'un réseau de laboratoires i) agréé dans le cadre des analyses bactériologiques portant sur les cas de hausses de mortalité de mollusques (analyses officielles) ou ii) reconnu pour la réalisation des auto-contrôles à la demande de la profession. Ce protocole est décrit en annexe (cf. annexe 1) dans le cadre d'une convention entre l'Ifremer et les différents laboratoires métropolitains. Ce travail est en cours de publication (projet article 5).

De plus, pour des objectifs propres aux travaux de thèse, plusieurs tests de détection et de quantification par PCR en temps réel ont été développés. Le premier outil de PCR, utilisant la chimie Taqman, permet une quantification rapide, spécifique et sensible de *V. aestuarianus* dans différents types d'échantillons : culture bactérienne, hémolymphe, broyat de tissus, eau de mer. Ce travail fait l'objet de l'article 2 suivant (cf. chapitre 1, partie 2). Le même type d'outil de PCR en temps réel a été mis au point pour la détection et la quantification de la souche *V. splendidus* LGP32-GFP utilisée pour les infections expérimentales. Enfin, un test de quantification de la flore vibrionacée totale par PCR

temps réel utilisant la chimie SyBr Green a également été mis au point. Ces deux derniers tests sont valorisés dans l'article 4 apparaissant dans le chapitre 3 consacré à une étude de pathogenèse.

L'ensemble de ces outils est disponible et peut être appliqué dans un grand nombre d'autres études perspectives, *in situ* et expérimentales, de pathogenèse, de suivis épidémiologiques, dans différents compartiments, environnementaux ou tissulaires.

- Développement d'un outil d'infection expérimentale impliquant *V. splendidus* et *V. aestuarianus*

Les deux groupes de *Vibrio* présentent des caractéristiques biologiques et écologiques différentes :

- les souches étudiées appartenant au groupe polyphylétique *V. splendidus*, ubiquistes et détectées chez les 4 espèces de mollusques étudiées et associées à toutes les classes d'âge de l'huître creuse, montrent une pathogénicité variable pour *C. gigas* en infection expérimentale, induisent un pic d'infection dès le premier jour post-injection et présentent également une capacité variable à produire *in vitro* une activité de type métalloprotéase ;
- quant aux souches étudiées appartenant au groupe monophylétique *V. aestuarianus*, elles ne sont détectées que chez *C. gigas* aux stades juvénile et adulte, apparaissent toutes pathogènes pour l'huître creuse en infection expérimentale, induisent un pic d'infection débutant au 2^{ème} jour post-injection et présentent toutes une capacité à produire *in vitro* une activité de type métalloprotéase.

La diversité biologique et écologique de ces deux groupes de *Vibrio* et leur dominance dans ces phénomènes en font des modèles de choix pour le développement de vibrioses expérimentales visant la compréhension des épisodes de mortalités estivales. Outre la dominance commune de leur association dans les épisodes de mortalités estivales étudiés, ces deux *Vibrio* ont été à plusieurs reprises détectés dans le même échantillon individuel suggérant l'existence d'interactions particulières entre ces deux espèces de *Vibrio*. La synergie mise en évidence en co-injection expérimentale illustre ce dernier point et ouvre des perspectives intéressantes sur la nature et la caractérisation des mécanismes impliqués. De plus, ce phénomène de synergie, imaginé dans les multiples interactions entre les espèces composant la flore endogène complexe de l'huître, peut apparaître comme un élément d'amplification des épisodes de mortalité, qui impliqueraient alors un certain nombre de bactéries capables de favoriser mutuellement leur propres mécanismes de virulence. De la même façon, on peut imaginer des phénomènes d'interaction avec des agents infectieux de nature différente, tel l'herpès virus OsHV-1, dont le développement pourrait être favorisé par la production de toxines bactériennes. Ainsi, l'ensemble de ces éléments nous a conduits au développement d'un outil

d'infection expérimentale reproductible et combinant l'action de ces deux espèces de *Vibrio* : ce modèle de co-injection expérimentale s'est avéré performant pour l'étude d'interactions hôte-pathogène et notamment de l'effet de quelques facteurs de l'huître creuse sur sa sensibilité aux vibrios. Sa valorisation sous forme d'article (Article 3) est présentée dans le chapitre 2.

Afin d'explorer ce phénomène de synergie observé entre *V. splendidus* et *V. aestuarianus*, et les activités de type métalloprotéase apparaissant comme des facteurs communs aux *Vibrio* pathogènes étudiés de l'huître creuse et corrélés à leur virulence, la modulation de leur production et de leur expression au niveau transcriptionnel *in vitro* par un phénomène de quorum sensing a été analysée. Cette étude fait l'objet de la partie 3 de ce chapitre 1 et sera par la suite valorisée sous forme de publication.

2 Article 2 : Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: a useful tool for epidemiologic studies.

Denis Saulnier, Sophie De Decker, Philippe Haffner

Journal of Microbiological Methods, 2009, vol. 77, p. 191-197

DOI:10.1016/J.mimet.2009.01.021

Title

Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: a useful tool for epidemiologic studies.

Journal of Microbiological Methods, 2009, vol. 77, p. 191-197

DOI:10.1016/J.mimet.2009.01.021

Authors

Denis Saulnier^{1*}, Sophie De Decker¹, Philippe Haffner¹

¹ Laboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER, av. du Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France

* Corresponding author: Denis Saulnier

Laboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER, BP 33, av. du Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France

Tel: 33 5 46 76 26 46, Fax: 33 5 46 76 26 11, denis.saulnier@ifremer.fr

Abstract

Because *Vibrio aestuarianus* is known to cause serious infections in Pacific oyster *Crassostrea gigas*, a real-time PCR assay was developed targeting the *dnaJ* gene of this bacterium. Only *V. aestuarianus* strains isolated from *C. gigas* mortality events in different geographic areas and the reference strain tested positive, whereas no amplification products was obtained with type strains belonging to 23 other species of *Vibrio*. Sensitivity and reproducibility of the method were assessed using either seawater or oyster homogenate samples spiked with one *V. aestuarianus* strain. All these samples were stored at -20°C in order to mimic retrospective or grouped natural sample analysis without quantification bias due to prolonged freezing. Analysis of standard curves revealed excellent correlation values between light microscopy cell enumerations and PCR Threshold Cycle (Ct) values, and acceptable PCR reaction efficiencies for all type of samples. Quantification curves of both sample types were equivalent, with a detection level as low as 1.6 *V. aestuarianus* cells in the PCR reaction tube, corresponding to 1.6 10² cells ml⁻¹ and 1.6 10² cells mg⁻¹ in seawater and entire oyster samples, respectively, taking into account the dilution factor used for appropriate template DNA preparation. Comparison of PCR assay reproducibility according to the complexity of samples revealed that seawater samples gave more reproducible quantification measures than samples from oyster homogenate, with precision of measured Ct values inferior to 0.4 and 0.6 respectively at 99% confidence. Use of the real-time PCR assay allowed us to monitor *V. aestuarianus* load in oysters naturally infected with this pathogen. Furthermore, we were able to detect *V. aestuarianus* in samples of seawater in which oysters had been reared and in algal cultures used for feeding oysters. Because of the rapidity and reliability of the real-time PCR assay method used in this study, just a few hours are needed compared with the two days required using the classic culture method, this technique will be particularly valuable in mollusc pathology laboratories, for monitoring the source and course of infections by *V. aestuarianus* in pathogenesis and epidemiologic studies, as well as for designing appropriate prophylactic control measures.

Key words

Crassostrea gigas; Oyster; pathogen; real-time PCR; Taqman; *Vibrio*; *V. aestuarianus*.

Introduction

Diseases caused by infectious agents pose threats to aquaculture worldwide. Cultivated oysters represent the main aquacultural production species of France and China, and are at risk to such infections in their rearing environment. Many oyster diseases have been reported to be caused by protozoa, fungi, viruses (Elston, 1993, McGladdery, 1999) as well as by bacteria, which were initially described mainly in larval stages of hatchery-produced oysters (Sinderman, 1990). More recently, bacteria causing disease in juvenile to adult stages have been reported and characterised. *Roseovarius crassostreae* was described as the etiological agent of juvenile oyster disease of *Crassostrea virginica* (JOD) occurring on the northern Atlantic coast of the United States (Boettcher et al., 1999, Boettcher et al., 2005). An actinomycete bacteria *Nocardia crassostreae* detected in North America and Japan was responsible for oyster summer mortality events in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Friedman et al., 1998, Friedman et al., 1991). Furthermore, two *Vibrio* species, *V. aestuarianus* and *V. splendidus* were found to be associated with summer mortality phenomena of *C. gigas* oysters reared in France (Garnier et al., 2007, Gay et al., 2004, Labreuche et al., 2006b, 2001, Le Roux et al., 2002).

V. aestuarianus has frequently been associated with massive mortality events in *Crassostrea gigas* oysters occurring during summer. These events often occur when seawater temperatures reach 19°C on the French Atlantic coast, and affect mainly young individuals of 1 to 2 years in age (Garnier et al., 2007). Classic bacteriology studies revealed that these moribund animals were predominantly infected with *V. aestuarianus*, found at septicaemic concentrations in the hemolymph but also in other oyster tissues, whereas apparently healthy oysters collected at the same locations generally only harboured a low load of *V. aestuarianus* cells in their tissues (Garnier et al., 2007). The same authors demonstrated that a majority of *V. aestuarianus* strains found dominant in the hemolymph of moribund animals were virulent in experimental challenges, inducing more than 50% cumulative mortalities 5 days post injection. Some pathogenesis studies have emphasized their probable mode of action. A virulent *V. aestuarianus* strain (01/32) was shown to impair the function and survival of immuno-competent cells, known as hemocytes, by producing toxins. Treatment of hemolymph *in vitro* with extracellular products produced by this pathogenic strain was shown to induce a significant inhibition of both hemocyte adhesive properties and phagocytosis, and an enhancement of reactive oxygen species (Labreuche et al., 2006b). Similar results were found with an *in vivo* approach performed by experimental infection using the 01/32 bacterial strain, which also demonstrated a deregulation in the hemocyte oxidative metabolism (Labreuche et al., 2006a).

Traditional identification and quantification methods currently used for *Vibrio* species associated with mortality events in organisms of aquacultural interest are based on the cultivability of bacteria on non-selective synthetic medium. Procedures are time-consuming and laborious, requiring long incubation

times, and even though a few isolates are well characterized taxonomically, quantification is often extrapolated from the macroscopic or visual aspect of colonies on nutrient agar plates. Furthermore, these methods may underestimate the number of target bacteria because of natural microbial competitors present in analyzed samples. High levels of background microflora may also cause inefficiency as these produce confluent growth on the plating media that can mask the target bacteria. To overcome these drawbacks, DNA-based methods such as PCR are being increasingly used. PCR methods provide rapid, specific and sensitive analysis of targeted *Vibrio*, but do not make quantitative measurements (Paillard et al., 2006, Pang et al., 2006, Saulnier et al., 2000). To evaluate bacterial presence quantitatively, several investigators have developed quantitative PCR strategies in molluscs, but only for bacteria causing diseases in humans (Blackstone et al., 2003, Campbell and Wright, 2003, Gordon et al., 2008, Lyon, 2001, Nordstrom et al., 2007). The general principle of these methods lies in their ability to detect and quantify DNA targets by monitoring PCR product accumulation during the early exponential phase of amplification, indicated by increased fluorescence. Available chemistries include DNA-intercalating agent SYBR Green I and dual-labelled oligonucleotidic probe, hydrolysed by 5' exonuclease activity of Taq polymerase during elongation step. This latter method has been extensively used and offers an additional level of specificity, compared with primers used alone, due to the hybridization of fluorescent oligonucleotidic probe to a specific sequence of amplicon (Heid et al., 1996, Holland et al., 1991).

The goal of the current study was the development and evaluation of a real-time PCR assay that would provide a rapid, sensitive and quantitative method for the detection of *V. aestuarianus* cells in pure cultures, seawater and oysters. In order to allow retrospective or grouped sample analyses, which are particularly helpful in saving time during DNA extraction steps, real-time PCR assay was evaluated under conditions where samples were stored at -20°C prior to analysis. To our knowledge, this is the first report on the development of a molecular-based method for the quantitative detection of a bacterial pathogen of a mollusc.

Materials and methods

Bacterial strains and culture conditions

A total of 34 bacterial strains, including *V. aestuarianus* (n=11) and other *Vibrio* species reference strains (n=23) was used to assess the specificity of the oligonucleotidic probe and primers (Table 1). All *V. aestuarianus* strains, apart from the *V. aestuarianus* type strain (Tison and Seidler, 1983), were identified by 16S gene sequencing and isolated from *C. gigas* reared in France and collected during mortality events occurring between 2003 and 2007.

All strains were cultured in Marine Broth (MB) purchased from Difco, prepared as peptone 4%, yeast extract 1% diluted in Sterile Artificial Sea Water (SASW 2.3% NaCl, 20 mM KCl, 5 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂) from bacterial stock culture stored at -80 °C and prepared as 15% (v/v) glycerol suspensions in MB. After incubation at 20 °C for 20 h under constant shaking, bacterial suspensions at stationary-phase were enumerated by light microscopy using a Malassez counting chamber.

Table 1: Specificity of the TaqMan PCR assay according to bacterial strains of different origins.

Strain	<i>Vibrio</i> species	Source and context of isolation	Real-time PCRq results (+/-)
ATCC35048 ^T	<i>V. aestuarianus</i>	Oyster, US	+
02/041	<i>V. aestuarianus</i>	<i>C. gigas</i> oyster, 2002 mortality episode in a hatchery, Argenton, Finistère, France (Garnier et al., 2007)	+
05/091 1T1	<i>V. aestuarianus</i>	<i>C. gigas</i> oyster, 2004 mortality episode in an indoor breeding structure, Ronce Les Bains, Charente-Maritime, France	+
04/021 3T1	<i>V. aestuarianus</i>	<i>C. gigas</i> oyster, 2004 mortality episode in an indoor breeding structure, Ronce Les Bains, Charente-Maritime, France	+
04/047 3T1	<i>V. aestuarianus</i>	<i>C. gigas</i> oyster, 2004 mortality episode in an indoor breeding structure, Ronce Les Bains, Charente-Maritime, France	+
03/011 1T1	<i>V. aestuarianus</i>	<i>C. gigas</i> oyster, 2003 mortality episode in an indoor breeding structure, Ronce Les Bains, Charente-Maritime, France	+
03/146 2T1	<i>V. aestuarianus</i>	<i>C. gigas</i> oyster, 2003 mortality episode in an oyster growout pound, Charente-Maritime, Angoulins, France	+
04/055 2T3	<i>V. aestuarianus</i>	<i>C. gigas</i> oyster, 2004 mortality episode in an open sea rearing farm, Arcachon Bay, Gironde, France	+
07/083 1T1	<i>V. aestuarianus</i>	<i>C. gigas</i> oyster, 2007 mortality episode in an open sea rearing farm, Marennes Oleron Bay, Gironde, France	+
07/046 1T1	<i>V. aestuarianus</i>	<i>C. gigas</i> oyster, 2007 mortality episode in an open sea rearing farm, Olonne, Vendée, France	+
07/080 1T2	<i>V. aestuarianus</i>	<i>C. gigas</i> oyster, 2007 mortality episode in an open sea rearing farm, Marennes Oleron Bay, Gironde, France	+
CECT 4600 ^T	<i>V. tapetis</i>	<i>Tapes philippinarum</i> , clam, France	-
LMG 4042 ^T	<i>V. splendidus</i>	Marine fish	-
CIP107166 ^T	<i>V. lentus</i>	Cultivated oyster, Spain	-
LGP 13 ^T	<i>V. gigantis</i>	<i>C. gigas</i> oyster mortality episode, France (Le Roux et al., 2005)	-
LGP 7 ^T	<i>V. crassostreae</i>	<i>C. gigas</i> oyster mortality episode, France (Faury et al., 2004)	-
LMG 20012 ^T	<i>V. tasmaniensis</i>	Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i> L.), Tasmania Australia	-
LMG 20537 ^T	<i>V. pomeroy</i>	Healthy bivalve larvae (<i>Nodipecten nodosus</i>), Brazil	-
LMG 20539 ^T	<i>V. kanaloe</i>	Diseased oyster (<i>Ostrea edulis</i>) larvae, France	-
LMG 19999 ^T	<i>V. pacinii</i>	Nauplii of shrimp <i>Penaeus chinensis</i> , China	-
LMG 21353 ^T	<i>V. chagasii</i>	Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>) larvae, gut, Norway	-
LMG 20547 ^T	<i>V. fortis</i>	Bivalve larvae (<i>Nodipecten nodosus</i>), Brazil	-
LMG 21359 ^T	<i>V. cyclitrophicus</i>	Creosote-contaminated marine sediment, US	-
LMG 3897 ^T	<i>V. pelagius</i>	Seawater enriched with succinate, US	-
DSMZ 16383 ^T	<i>V. superstes</i>	Gut of abalone <i>Haliotis rubra</i> , Australia	-
DSMZ 19502 ^T	<i>V. mediterranei</i>	Costal marine plankton, Spain	-
DSMZ 13774 ^T	<i>V. shilonii</i>	Bleached coral <i>Oculina patagonica</i> , Israel	-
DSMZ 16639 ^T	<i>V. gallicus</i>	Gut of abalone <i>Haliotis tuberculata</i> , France	-
DSMZ 17533 ^T	<i>V. ezuriae</i>	Gut of abalone <i>Haliotis diversicolor aquatilis</i> , Japan	-
DSMZ 17185 ^T	<i>V. xuii</i>	Shrimp culture water, China	-
DSMZ 17184 ^T	<i>V. brasiliensis</i>	Bivalve larvae (<i>Nodipecten nodosus</i>), Brazil	-
DSMZ 14398 ^T	<i>V. penaeicida</i>	Kuruma prawns (<i>Penaeus japonicus</i>), Japan	-
DSMZ 17186 ^T	<i>V. rotiferianus</i>	Rotifer <i>Brachionus plicatilis</i> culture, Belgium	-
CIP 107925 ^T	<i>V. corallilyticus</i>	Bleached tissue of coral, Pocillopora damicornis, Zanzibar	-

DNA extraction procedures

For specificity assessment of the real-time PCR assay, total DNA from pure colonies cultured in MB 15% Agar medium was extracted by boiling. Briefly, one bacterial colony was picked up with a sterilized toothpick and resuspended in 100 µl of ultra pure water (Sigma). This mixture was boiled for 10 min at 98 °C and then placed at 4 °C for few minutes before PCR assay. Five µl of the solution were used in duplicate as a PCR template.

For detection and quantification of *V. aestuarianus* by the real-time PCR assay, total DNA from all samples (either those obtained from the rearing environment or artificially spiked with *Vibrio* cells, see section 2.5 below) was extracted with a QIAmp DNA minikit (Qiagen). Samples of 200 µl were centrifuged at 10 000 g and 4 °C for 5 min. After DNA extraction following manufacturer's instructions, pelleted DNAs were resuspended in 100 µl or 10 ml of ultra pure water for seawater and oyster samples, respectively, and stored at -20°C. DNA yield and purity were determined by spectrophotometry (Eppendorf).

PCR primers and fluorogenic probe

Oligonucleotide sequences were derived from the sequence alignment of the *dnaJ* housekeeping gene in different *Vibrio* species including *V. aestuarianus* type strain (Nhung et al., 2007). Primer 3 software was used to design a real-time PCR probe (Table 2) and forward and reverse PCR primers, taking into account optimal thermal and chemical conditions for PCR amplification compatible with probe hydrolysis based qPCR. The probe consists of an oligonucleotide dually labelled with a 5'-reporter dye Texas Red and a downstream 3'-quencher dye BHQ-2 (Eurogentec). The probe and primers were assessed for species specificity using a BLAST search to determine homology to known sequences.

Table 2 : Nucleotide sequences and melting temperature (T_m) of primers and probes for real-time PCR reaction.

Name	Function	Sequence (5'-3')	T _m (°C)
<i>DNAj</i> aes F1	Forward primer	GTATGAAATTTTAACTGACCCACAA	58
<i>DNAj</i> aes R1	Reverse primer	CAATTTCTTTTCGAACAACCAC	59
<i>DNAj</i> probe	TaqMan PCR probe	TGGTAGCGCAGACTTCGGCGAC	71

***V. aestuarianus* real-time PCR assay conditions**

Real-time PCR assay was conducted on MX3000 Thermocycler (Stratagene) using Brilliant QPCR Core Reagent Kit (Stratagene). Each reaction was run in triplicate in a final volume of 25 μ l containing various concentrations of DNA sample (5 μ l), 5 mM MgCl₂, 200 μ M of each dNTP, 300 nM of each primer, 200 nM of oligonucleotidic probe and 1.25 units of hot start Sure Taq polymerase. The thermal cycle was performed with a two-step PCR protocol: 1 cycle at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60°C for 90 s. Fluorescence intensity was expressed in delta reporters (dR) after background subtraction. Threshold was set using amplification based algorithm from MX3000 software (Stratagene) for the initial plate. For other plates we used an interplate calibrator to set the threshold manually. Threshold Cycle (Ct) value corresponded to the PCR cycle number at which an increase in reporter fluorescence above a baseline signal was first detected.

Quantification of V. aestuarianus in artificially spiked samples

Oysters (from Prévost lagoon on French Mediterranean coast) and SASW samples were artificially spiked with an early stationary phase pure defined culture of *V. aestuarianus* 02/041 strain. The bacterial suspension was centrifuged at 3200 g for 10 min at 20 °C and cells resuspended in SASW to obtain an optical density (OD) of 2, at a wavelength of 600nm. Quantification of bacterial cells by real-time PCR in spiked samples was compared with the enumeration of bacterial cells using a Malassez counting chamber.

All *Crassostrea gigas* oyster samples collected were stored at -20 °C. After thawing, the whole flesh was recovered from the shell and rinsed with SASW. Fifteen animals were dissected into two equal parts in order to prepare three duplicated pools (5 half oysters in each pool). These pools were all diluted in SASW (1:10 w/v) and one replicate of each pool was seeded with *V. aestuarianus* 02/041 cells. Finally, all the six pools were crushed at 9500 r/min for 2 min using a conventional mixer. Each homogenate was stored at -20 °C.

Three independent ten-fold serial dilutions of artificially spiked oyster homogenates were generated, using corresponding non-spiked pools as diluents. Dilutions were produced in 2 ml and all samples were stored at -20 °C prior to analysis. After these samples were thawed, only 200 μ l was used for DNA extraction. For SASW samples, the same procedure was performed on three serial dilutions, replacing oyster homogenate with SASW.

Quantitative detection of indigenous *V. aestuarianus*

Apparently healthy one-year-old *C. gigas* oysters were purchased from Fouras, Charente Maritime in France on May 16, 2008. Thirty oysters were immediately stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. All the others were placed in a 200 L stabulation tank equipped with aerators, a closed seawater recirculation system and thermoregulation apparatus ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). Animals were fed with a mixture of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros gracilis* and monitored over a two month period. Mortalities were observed and were attributed to *V. aestuarianus*, as the pathogen was isolated and characterized by classic culture and identification methods and found dominant in the hemolymph of the dying animals. Following the onset of mortalities, recently dead oysters were collected from the tank at different times; apparently healthy oysters were also collected to serve as controls. All these animals were stored whole at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. During the same period, seawater samples of different origins were collected in sterile plastic tubes and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. This sampling was done from different places around the oyster rearing facilities: samples were thus taken of *Chaetoceros gracilis* algae tanks, seawater distributed to oyster tanks and seawater from an oyster growout pond in the vicinity of the rearing facilities.

All these samples were prepared in exactly the same way as the spiked samples described above. Briefly, oysters were crushed in SASW, DNA extracted from a 200 μl sample and pelleted DNA was finally resuspended in 10 ml ultra pure water. For algae or seawater samples, DNA was extracted from a 200 μl sample and resuspended in 100 μl of ultra pure water. Indigenous *V. aestuarianus* load was evaluated by real-time PCR using standard curves.

Results

Real-time PCR assay using dual labelled probe

Our PCR primers and real-time PCR probe were designed to target the more divergent nucleotidic regions of the *dnaJ* gene sequences from strains belonging to 57 *Vibrio* species (Genbank n° AB263017 to AB263073). Sequence alignment comparisons showed that the forward and reverse primer pair had 9 to 15 nucleotidic sites specific for *V. aestuarianus* type strain, out of 56. Furthermore, the nucleotidic sequence of the probe targeted an additional codon present in *V. aestuarianus* and ten other *Vibrio* species, but lacking in most other *Vibrio* species (n=46). However, the probe sequence encompassed at least 4 to 8 *V. aestuarianus* specific nucleotides absent from the other ten *Vibrio* species displaying the additional codon.

Species specificity of the real-time PCR assay was evaluated by testing several *V. aestuarianus* strains isolated during *C. gigas* mortality events and reference strains belonging to different *Vibrio* species, among which some were phylogenetically related to *V. aestuarianus*. The real-time PCR assay amplified the DNA of all the *V. aestuarianus* strains tested (n=11), including the ATCC35048^T reference strain, and only the DNA of this species. No positive amplification signals were obtained with any of the non-*V. aestuarianus* strains (n=23) tested in this study (Table 1). Amplified PCR product size was verified by gel electrophoresis, visualizing a 266-bp long amplicon (not shown).

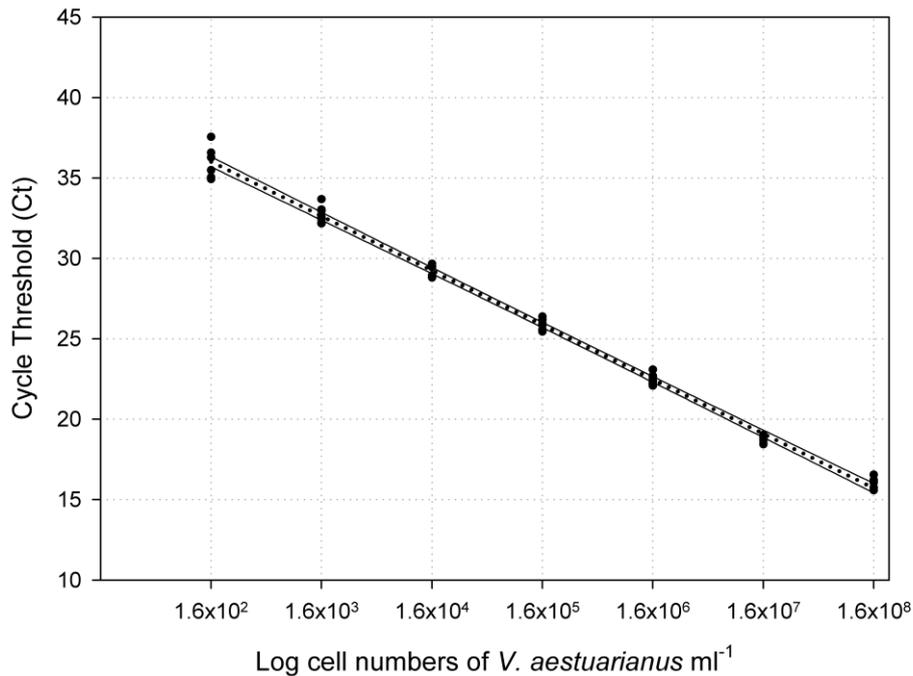


Figure 1 : Standard curves for *V. aestuarianus* real-time PCR in 10 fold dilution of artificially spiked SASW. Standard curves were generated by plotting the log cell number of bacteria versus the threshold cycle (Ct) value. Each plot corresponds to individual Ct values obtained from the three independent replicate experiments. One linear regression, represented by the dotted line (•••), was obtained by collectively treating all the data with r^2 of 0.995 and PCR reaction efficacy of 97.6%. A confidence line or intervals were established which describes the precision around the regression line at 99% confidence, represented by a solid line.

The three standard curves obtained in SASW samples spiked with *V. aestuarianus* strain 02/041, determined by enumeration on Malassez counter chamber and real-time PCR on purified DNA, showed excellent correlations (linear regression with r^2 coefficients of 0.996, 0.993, 0.997) and acceptable PCR reaction efficacies (96%, 97%, 100%) according to Ct values obtained in triplicate (data not shown). Because similar quantification curves were obtained in these three independent experimental replicates, Ct values from the three experiment replicates corresponding to the same bacterial dilution were treated collectively and gave a single quantification curve with correlation and PCR reaction efficacy of 0.995 and 98% respectively (Fig. 1). A linear range of values for PCR amplification was achieved for dilutions of pure bacterial suspensions ranging from 1.6×10^8 to 1.6×10^2 cells ml⁻¹, corresponding to DNA extracts ranging from 10 µg ml⁻¹ to 10 pg ml⁻¹, as measured by spectrophotometry. Precision of measured Ct values is inferior to 0.4 at 99% confidence, as shown in figure 1. Repetition of these experiments, by the addition of a mixture of *V. tapetis* and *V. splendidus* type strains (10^5 cells each) in all 02/041 cell dilutions prior to DNA extraction revealed that exogenous DNA had little or no influence on cycle threshold values (Fig. 2).

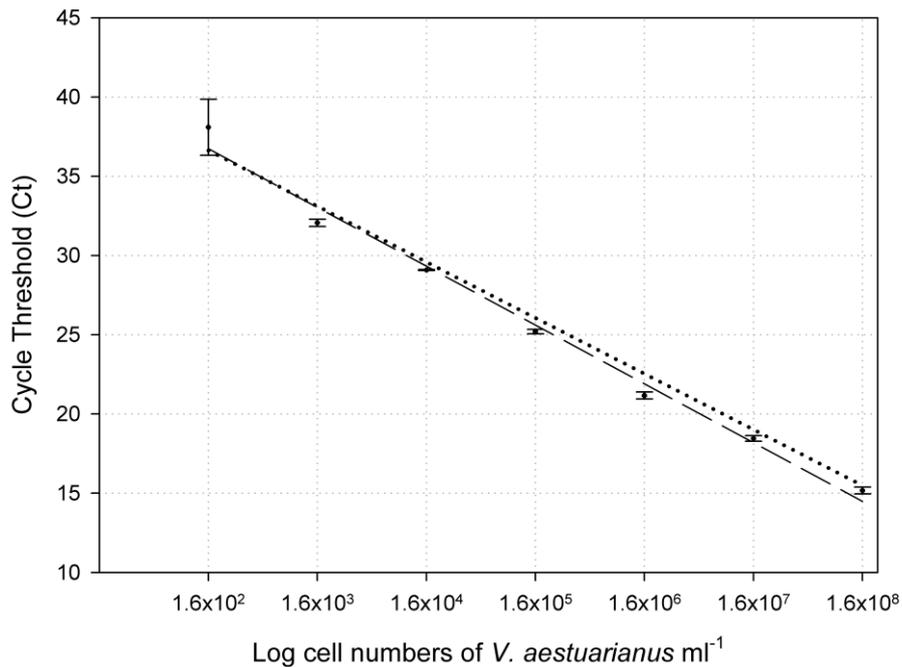


Figure 2 : Standard curves showing the log cell numbers plotted against the threshold cycle Ct of ten fold dilutions of *V. aestuarianus* in SASW artificially seeded (●) or not by a mixture of *V. tapetis* and *V. splendidus* type strains at 10^5 cells each. One regression curve, represented by the dotted line (•••), was identical to the one represented in Figure 1B, whereas the other, represented by the dashed line (—), defined by a r^2 of 0.994 and PCR reaction efficacy of 90.6%, was obtained in presence of a mixture of *V. tapetis* and *V. splendidus* cells. Each plot represented by the symbol (●) corresponds to the mean of Ct values of three technical replicates. Standard deviations are represented by vertical bars.

Enumeration of V. aestuarianus in artificially inoculated oyster homogenate

Real-time PCR assay on DNA extracted from the three pools of half oysters used as diluent in sensitivity assays yielded no amplification signals. The three corresponding pools of half oyster homogenates were seeded with pure cultures of *V. aestuarianus* strain 02/041 ranging from 1.6×10^8 to 16 cells ml^{-1} , as confirmed by the Malassez counting chamber method. The three quantification curves were similar, exhibiting correlations of $r^2 = 0.993$, 0.989 and 0.99 and PCR reaction efficacies of 98%, 88%, 95% when dilutions of pure bacterial suspensions ranged from 1.6×10^8 to $1.6 \times 10^4 \text{ cells ml}^{-1}$ (data not shown). Spectrophotometric analysis of the DNA content of extracted samples revealed different concentrations according to the oyster pools tested (281 , 45 , $283 \mu\text{g ml}^{-1}$).

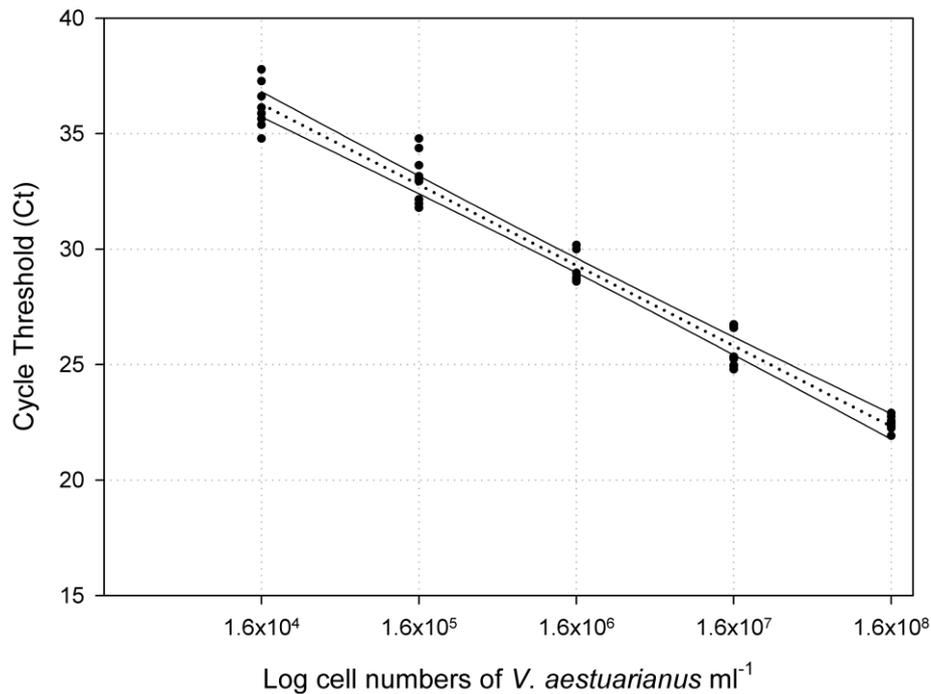


Figure 3 : Standard curves for *V. aestuarianus* real-time PCR in 10 fold dilution of artificially spiked oyster homogenates. Standard curves were generated by plotting the log cell number of bacteria against the threshold cycle (Ct) value. Each plot corresponds to individual Ct values obtained from the three independent experiments. The linear regression, represented by the dotted line (•••), was obtained treating collectively all the data with r^2 of 0.976 and PCR reaction efficacy of 93.5%. A confidence line or intervals were established which describes the precision around the regression line at 99% confidence.

These DNA concentrations were not affected by artificial seeding with *V. aestuarianus* cells, whatever their dilution in the pools. Treatment of Ct values collectively yielded a single quantification curve with ΔCt precision values less than 0.6 at 99% confidence (Fig. 3) and 94% PCR efficacy. Comparison between collectively-treated quantification curves, obtained by artificial inoculation of either SASW or oyster homogenate, revealed similar detection levels of *V. aestuarianus* in the range $1.6 \cdot 10^4$ to 1.6 cells by real-time PCR, taking into account the dilution factor used for appropriate template DNA preparation (1 or 100 respectively) (Fig. 4).

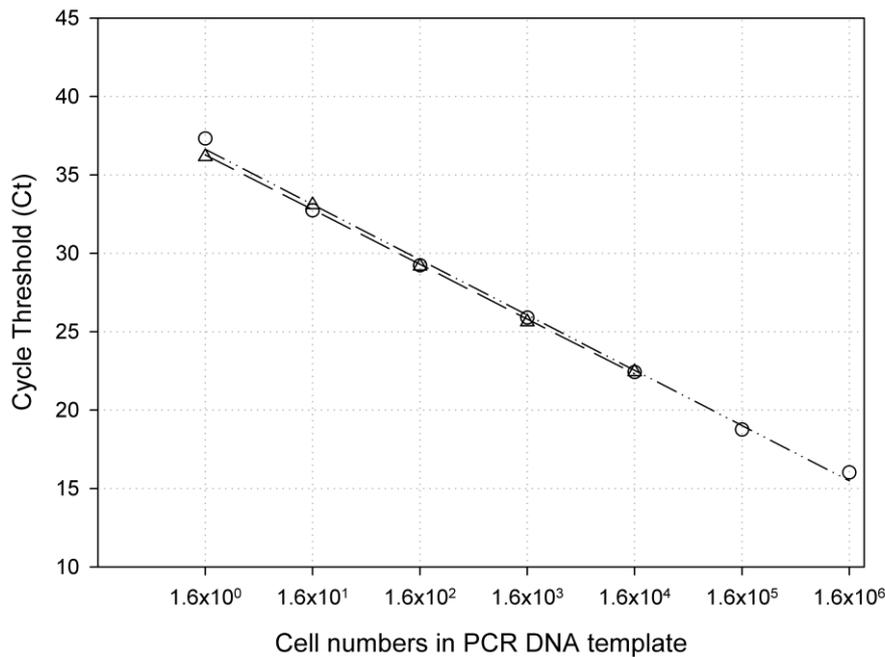


Figure 4 : Standard curves generated by plotting the log cell number of bacteria against the threshold cycle (Ct) value of collectively-treated quantification curves obtained by artificial inoculation with *V. aestuarianus* of either SASW or oyster homogenate represented by symbols (o) and (Δ) respectively. The dilution factor used for appropriate template DNA preparation (1 or 100 respectively) is taken into account to calculate the log cell number of bacteria in each PCR well.

Detection of V. aestuarianus in environmental samples

All the tested samples were collected between May 16 and June 13 2008 at an oyster breeding facility, during an episode of oyster mortality. Twenty oysters were randomly sampled on arrival, which was one week before the onset of mortalities (May 23). At this point, *V. aestuarianus* was detected and quantified at a low level in a few individuals (n=2 among 20 tested animals). The bacterial load was 194 cells mg⁻¹ tissue in these two animals, according to the Ct values and standard curves of our real-time PCR assay. One week after the onset of mortalities, *V. aestuarianus* was detected in all moribund animals that were tested (n=5), at a mean concentration of 10473 cells mg⁻¹. In contrast, *V. aestuarianus* was only detected in 1 out of the 5 apparently healthy animals tested from the same sampling date, and at the very low concentration of 40 cells mg⁻¹.

The seawater samples were taken (1) from algal cultures used for oyster feeding (n=3, collected on May 30, June 4 and June 13), (2) from an oyster growout pond (n=1, collected on May 16), and (3) from the water supply network of tanks where oyster mortalities were observed (n=1, collected on

June 12). Interestingly, *V. aestuarianus* cells were detected in all these samples and ranged from 25 to 400 cells ml⁻¹.

Discussion

There are few ways to limit the detrimental effect of mollusc pathogens. Drug treatment is unconceivable in the open sea where animals are commonly reared, due to the dispersion or dilution of the molecules and their negative impact on the environment (Berthe, 2000). Furthermore, immune stimulation is impractical at present because we do not know enough about adaptive immunity mechanisms of these organisms (Flajnik and Du Pasquier, 2004). In this context, there is a need for rapid, quantitative and accurate measurements of target organisms, which will allow us to evaluate appropriate prophylactic and disease control strategies. *V. aestuarianus* is of particular concern as it has been seen to be responsible for mortality episodes in the Pacific oyster *C. gigas*.

PCR primers and a real-time PCR probe were designed to target the *V. aestuarianus dnaJ* gene that encodes a heat shock protein of 40 kDa. This gene has been shown to be a suitable target for identification of *Vibrio* species because it has a higher discriminatory power than the 16S rDNA gene and other housekeeping genes such as *recA* and *rpoA* (Nhung et al., 2007). The genus *Vibrio* currently encompasses 88 species (Euzéby, 1997), including 10 more new species designated between 2007 and 2008 in the International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. We used three variable sequence regions of *dnaJ* in 56 different *Vibrio* species for the design of the PCR primers and real-time PCR probe, and purchased the sequences for these 56 different *Vibrio* species. The primers and probe we developed were able to amplify DNA from 100 % of the tested *V. aestuarianus* isolates, and our real-time PCR was found to have a specificity of 100 % when testing reference strains belonging to 23 different *Vibrio* species. The protocol used in specificity assays could be useful for rapid identification of *V. aestuarianus* isolates cultivated on nutrient agar plates since DNA extraction by boiling takes just 10 min and real-time PCR 110 min.

The standard curves generated using real-time PCR with seawater and oyster inoculated with *V. aestuarianus* demonstrated excellent correlations with ten fold dilutions of *Vibrio* cells, first enumerated under a light microscope in a Malassez chamber. Whatever the nature of the samples tested, efficiencies of the PCR reaction were close to the desired efficiency of 100% indicating that the increase in *V. aestuarianus* cells is directly proportional to the number of amplification cycles. The results obtained from technical triplicate reactions were very consistent (with a mean variation of about 2% around the mean Ct). Furthermore, the low level of inter-assay variation among the 3 experimental replicates on spiked seawater and oyster samples, with low standard deviations for the calculated Ct values whatever *Vibrio* cell concentration, demonstrated the reproducibility and precision of our real-time PCR assay. Precision Ct values were less than 0.4 and 0.6 for spiked seawater and oyster samples, respectively (99% confidence).

The detection limits of the PCR assay were estimated to be $1.6 \cdot 10^2$ cells ml^{-1} and $1.6 \cdot 10^2$ cells mg^{-1} in seawater and oyster samples, respectively, and corresponded to 1.6 *V. aestuarianus* cells in the PCR reaction in both cases, taking into account the dilution factor used for appropriate template DNA preparation. Nevertheless, at this low concentration, some real-time PCR technical replicates generated no amplification signals at all. When few *V. aestuarianus* cells were added to the PCR reaction, therefore, results appeared to be influenced by a stochastic effect. Indeed 3 out of 9 measurements on seawater samples were found negative with Ct values below the threshold value, which partly explains the observed increase in standard errors.

In order to quantify *V. aestuarianus* cells in seawater samples or naturally infected oysters, sensitivity assays were performed, using SASW or homogenates of pools of half oysters without *V. aestuarianus* as diluents, to determine standard curves under conditions where PCR inhibitors might be present in the DNA extract samples tested. Sensitivity and reproducibility of the real-time PCR assay were assessed by storing samples for several weeks at -20°C before DNA extraction to test whether retrospective or grouped natural sample analysis would be possible without quantification bias due to freezing. In contrast to the seawater samples, a complete inhibition of PCR was seen with oyster homogenates when the purified DNA was resuspended in the same ultra pure water volume as the seawater samples, i.e. 100 μl , whatever the dilution of spiked *V. aestuarianus* cells. As mentioned by Cankar and co-workers (Cankar et al., 2006), reliability of quantification by real-time PCR depends crucially on the quality of the sample DNA analysed. When oyster DNA extracts were diluted 10 fold in ultra pure water, PCR inhibitions were only observed in two out of the three pools of spiked oyster homogenate used as diluent. As care was taken to dilute DNA extracts from all samples obtained in the three replicated experiments, using 10 fold more, resulted in successful PCR with no detectable inhibition regardless of the dilution range of spiked *V. aestuarianus* cells – as shown by the near 100 % PCR reaction efficiencies. Similar observations have been made by several authors working notably on the detection and quantification of target organisms responsible for food poisoning by consumption of raw oysters. For example, Kaufman and co-workers (Kaufmann et al., 2004) showed that there was considerably less inhibition of real-time PCR with mantle fluid than with oyster tissue for *V. parahaemolyticus* quantification, due the damaging effects of the complexity of raw oyster matrix DNA on PCR efficacy. In the present study, inhibition noted in pure and 1 log diluted extract samples seemed more related to an excess of DNA (200 to 1500 ng per PCR reaction) from oyster origin in PCR reaction mix than to the presence of any polymerase inhibitors present in oyster tissues, since the A260/280 purity ratios ranged between 1.5 and 1.8 in all samples indicating that the DNA extraction protocol had worked correctly. Comparing detection limits of our real-time PCR assay with that of Lyon (Lyon, 2001), who was quantifying *V. cholera* in synthetic seawater and raw oyster, values were slightly less in seawater with $1.6 \cdot 10^2$ cells ml^{-1} in our study compared with the level of 10 colony forming units (CFU) ml^{-1} in this previous study. In contrast, a significantly lower detection limit of

approximately 4 log of magnitude was obtained in the present study on oyster samples with $1.6 \cdot 10^2$ cells mg^{-1} compared with the 6 to 8 CFU/g in Lyon's study. This discrepancy could be explained by the fact that synthetic medium (alkaline peptone medium) was used to establish standard curves in the cited study rather than complex matrix DNA extracted from raw oysters as in the present one, which required a 100 fold dilution of DNA extracts to overcome PCR inhibitors inherent to oysters tissues.

As a preliminary study, our real-time PCR was also applied to a natural oyster mortality episode. It is important to note that apparently healthy animals were already infected by *V. aestuarianus* the day they arrived at the breeding facility, as revealed by our real-time PCR assay, but at low level and prevalence. The pathogen was also detected and quantified in different samples such as algae for oyster feeding and the water network supplying tanks where oysters were reared, though these samples were taken 7 to 21 days after the onset of mortalities. These findings demonstrate the interest of our PCR assay to deepen future epidemiological studies. One could ask whether the transferred oysters introduced the pathogen into the rearing facilities or whether the pathogen was already present there and exacerbated the spread of *V. aestuarianus* infection in these oysters. Because *V. aestuarianus* was detected on the day of arrival in apparently healthy, but infected, oysters and in one seawater sample from an oyster growout pond only 200m from the rearing facility, it seems that the pathogen was already present in the environment.

Because of the rapidity and reliability of the real-time PCR assay method used in this study, just a few hours are required to obtain results compared with two days using classic culture method, this technique may be particularly valuable in mollusc pathology laboratories for monitoring the source and course of infections by *V. aestuarianus* and also for designing appropriate prophylactic control measures.

Acknowledgments

We thank Helen McCombie for her help with English editing. We are also grateful to Hervé Chaulet for a critical review of the manuscript and to Stratagene Company for funding support, as well as to Julien Normand and Jean-Côme Piquet for their advice during manuscript drafting.

References

- Berthe, F., 2000. Development and validation of DNA-based diagnostic techniques with particular reference to bivalve mollusc pathogens. In: Walker, P., Subasinghe, R. (Eds.), DNA-based molecular diagnostic techniques: research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases. FAO, Fisheries Technical Paper, Rome, pp. 64-70.
- Blackstone, G.M., Nordstrom, J.L., Vickery, M.C.L., Bowen, M.D., Meyer, R.F., DePaola, A., 2003. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 53, 149-155.
- Boettcher, K.J., Barber, B.J., Singer, J.T., 1999. Use of antibacterial agents to elucidate the etiology of Juvenile Oyster Disease (JOD) in *Crassostrea virginica* and numerical dominance of an alpha-proteobacterium in JOD-affected animals. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2534-2539.
- Boettcher, K.J., Geaghan, K.K., Maloy, A.P., Barber, B.J., 2005. *Roseovarius crassostreae* sp. nov., a member of the *Roseobacter* clade and the apparent cause of juvenile oyster disease (JOD) in cultured Eastern oysters. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1531-1537.
- Campbell, M.S., Wright, A.C., 2003. Real-Time PCR analysis of *Vibrio vulnificus* from oysters. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7137-7144.
- Cankar, K., Stebih, D., Dreo, T., Zel, J., Gruden, K., 2006. Critical points of DNA quantification by real-time PCR - effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnology* 6, 37.
- Elston, R.A., 1993. Infectious diseases of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Annual Review of Fish Diseases* 3, 259-276.
- Euzeby, J.P., 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. *International Journal of Systemic Bacteriology* 47, 590-592.
- Faury, N., Saulnier, D., Thompson, F.L., Gay, M., Swings, J., Le Roux, F., 2004. *Vibrio crassostreae* sp. nov., isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 2137-2140.
- Flajnik, M.F., Du Pasquier, L., 2004. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends in Immunology* 25, 640-644.
- Friedman, C.S., Beaman, B.L., Chun, J., Goodfellow, M., Gee, A., Hedrick, R.P., 1998. *Nocardia crassostreae* sp. nov., the causal agent of nocardiosis in Pacific oysters. *International Journal of Systemic Bacteriology* 48, 237-246.
- Friedman, C.S., Beattie J.H., R.A., E., R.P., H., 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.

- 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*. *Microbial Ecology* 53, 187-196.
- Gay, M., Berthe, F.C., Le Roux, F., 2004. Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* 59, 49-56.
- Gordon, K.V., Vickery, M.C., DePaola, A., Staley, C., Harwood, V.J., 2008. Real-Time PCR assays for quantification and differentiation of *Vibrio vulnificus* strains in oysters and water. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 1704-1709.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M., 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6, 986-994.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H., 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' - 3' exonuclease activity of thermus aquaticus DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 7276-7280.
- Kaufmann, A.F., Blackstone, G.M., Vickery, M.C., Bej, A.K., Bowers, J., Bowen, M.D., Meyer, R.F., DePaola, A., 2004. Real-Time PCR quantification of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters using an alternative matrix. *Journal of Food Protection* 67, 2424-2429.
- Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A., Nicolas, J.L., 2006a. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes and Infection* 8, 2715-2724.
- Labreuche, Y., Soudant, P., Goncalves, M., Lambert, C., Nicolas, J.L., 2006b. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental & Comparative Immunology* 30, 367-379.
- 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). *Diseases of Aquatic Organisms* 46, 139-145.
- 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. *Aquatic Living Resources* 15, 251-258.
- Le Roux, F., Goubet, A., Thompson, F.L., Faury, N., Gay, M., Swings, J., Saulnier, D., 2005. *Vibrio gigantis* sp. nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 2251-2255.
- Lyon, W.J., 2001. TaqMan PCR for Detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, Non-O1, and Non-O139 in Pure Cultures, Raw Oysters, and Synthetic Seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4685-4693.
- McGladdery, S.E., 1999. Shellfish diseases (viral, bacterial and fungal). In: Woo, P.T.K., Bruno, D.W. (Eds.), *Fish Diseases and Disorders*. CAB International, pp. 723-842.

- Nhung, P.H., Shah, M.M., Ohkusu, K., Noda, M., Hata, H., Sun, X.S., Iihara, H., Goto, K., Masaki, T., Miyasaka, J., Ezaki, T., 2007. The *dnaJ* gene as a novel phylogenetic marker for identification of *Vibrio* species. *Systematic and Applied Microbiology* 30, 309-315.
- Nordstrom, J.L., Vickery, M.C.L., Blackstone, G.M., Murray, S.L., DePaola, A., 2007. Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5840-5847.
- Paillard, C., Gausson, S., Nicolas, J.L., le Penne, J.P., Haras, D., 2006. Molecular identification of *Vibrio tapetis*, the causative agent of the brown ring disease of *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture* 253, 25.
- Pang, L., Zhang, X.H., Zhong, Y., Chen, J., Li, Y., Austin, B., 2006. Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the *toxR* gene. *Letters in Applied Microbiology* 43, 249-255.
- Saulnier, D., Avarre, J.C., Le Moullac, G., Ansquer, D., Levy, P., Vonau, V., 2000. Rapid and sensitive PCR detection of *Vibrio penaeicida*, the putative etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonia. *Diseases of Aquatic Organisms* 40, 109-115.
- Sinderman, C.J., 1990. *Diseases of Marine Shellfish. Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish.* Academic Press, San Diego.
- Tison, D.L., Seidler, R.J., 1983. *Vibrio aestuarianus*: a new species from estuarine waters and shellfish. *International Journal of Systemic Bacteriology* 33, 699-702.

3 Résultats annexes : Synergie, métalloprotéases et quorum sensing.

NB : Ce travail fera l'objet d'une publication dans les prochains mois. Il n'apparaît pas ci-dessous sous sa forme finalisée.

Introduction

L'expression de la virulence est dépendante d'un grand nombre de facteurs externes, auxquels sont soumis en permanence les bactéries pathogènes. La capacité des bactéries pathogènes à réguler leurs facteurs de virulence leur conférerait un avantage sélectif, en leur permettant à la fois d'investir une grande diversité de niches écologiques et de compartiments anatomiques de l'hôte et de s'adapter aux variabilités du milieu extérieur (Mekalanos, 1992; Milton, 2006).

Intensivement étudié depuis une dizaine d'années, le quorum sensing est un mécanisme de régulation contrôlant l'expression de certains gènes bactériens, basé sur la capacité des bactéries à communiquer entre elles en utilisant des signaux moléculaires. Ce mécanisme contrôlé par la densité cellulaire régule des fonctions physiologiques importantes comme la bioluminescence, la conjugaison, la virulence ou encore la formation de biofilm, et ce de façon concertée au niveau de la population (Kaprelyants et Kell, 1996; Wirth, *et al.*, 1996; Fuqua et Greenberg, 1998; Ren, *et al.*, 2001; Schauder et Bassler, 2001; Bassler, 2002; Defoirdt, *et al.*, 2005). Ce comportement coordonné est médié par des molécules autocrines diffusibles appelées phéromones ou autoinducteurs (Miller et Bassler, 2001; Waters et Bassler, 2005) : la concentration de ces molécules dans le milieu extracellulaire augmente parallèlement à l'accroissement de la population bactérienne jusqu'à atteindre un seuil induisant l'activation de l'expression de certains gènes.

Plusieurs systèmes de quorum sensing ont été décrits chez un grand nombre de bactéries Gram positif et Gram négatif, et diffèrent par les caractéristiques des autoinducteurs impliqués et le mode de détection. Chez les bactéries Gram négatif, le premier système décrit dans la littérature est celui contrôlant la bioluminescence de *V. fischeri* qui nécessite une haute densité cellulaire (Engebrecht, *et al.*, 1983). Par la suite, d'autres systèmes de ce type ont été décrits, notamment chez *V. harveyi*, dont le quorum sensing contrôle sa bioluminescence et régule l'expression de sidérophores, d'un système de sécrétion de type III et également d'une métalloprotéase (Henke et Bassler, 2004a). De plus, chez

V. harveyi, différentes voies ont été caractérisées et font intervenir des autoinducteurs différents : certains sont propres aux bactéries Gram négatif favorisant la communication intraspécifique (comme l'autoinducteur AI-1) et d'autres sont communs à de nombreuses espèces bactériennes suggérant des échanges interspécifiques (comme l'autoinducteur AI-2) (Bassler, *et al.*, 1997; Henke et Bassler, 2004b). Cette capacité de réponse à des niveaux intra- et inter-spécifiques, permettrait au vibron d'adapter la régulation de l'expression de certains gènes en fonction de la composition de la microflore dans laquelle il évolue (Milton, 2006).

Enfin, l'existence de mécanismes de quorum sensing régulant l'expression de gènes codant des métalloprotéases a été rapporté chez *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. vulnificus* et *V. anguillarum* (Shao et Hor, 2001; Zhu, *et al.*, 2002; Mok, *et al.*, 2003; Denkin et Nelson, 2004; Henke et Bassler, 2004a). Des travaux portant sur l'étude de la virulence de *V. anguillarum*, pathogène de la truite *Oncorhynchus mykiss*, ont montré l'implication des voies de quorum sensing dans le développement d'une vibriose expérimentale chez ce poisson : l'utilisation d'un inhibiteur du quorum sensing a permis de réduire significativement les taux de mortalité induites expérimentalement par *V. anguillarum* (Rasch, *et al.*, 2004). Des approches similaires ont montré l'inhibition de la virulence de *V. harveyi* chez *Penaeus monodon* grâce à l'utilisation d'antagonistes des signaux intercellulaires (Manefield, *et al.*, 2000). Interrompre ou du moins perturber cette communication intracellulaire pourrait constituer une stratégie limitant le développement des maladies infectieuses en aquaculture (Defoirdt, *et al.*, 2004), comme cela a déjà été envisagé pour le traitement de maladies bactériennes humaines (Hentzer et Givskov, 2003).

Quelques éléments nous permettent de faire l'hypothèse de l'existence de communication intercellulaire de type quorum sensing chez *V. splendidus*. En effet, il a été identifié par des analyses *in silico* à partir du génome de la souche *V. splendidus* LGP32, de nombreux gènes codant des facteurs décrits comme étant impliqués dans les voies de régulation du quorum sensing (des gènes *lux* comme *luxP*, *luxQ*, *luxU*, *luxO* et *luxR*) (Binesse, 2008). Même si l'implication de cette voie dans le contrôle de la virulence n'a pas encore été clairement démontrée chez *V. splendidus*, ces facteurs pourraient jouer un rôle dans la régulation de l'expression de la virulence chez cette espèce (Bassler, 2002).

Sur la base de ces éléments, et au vu du rôle clé que semblent jouer les métalloprotéases dans la virulence des deux souches étudiées pathogènes de *C. gigas* (Binesse, *et al.*, 2008; Saulnier, *et al.*, 2010), nous avons voulu explorer le phénomène de synergie observé entre les deux souches pathogènes *V. splendidus* LGP32-GFP et *V. aestuarianus* 02/041 en co-injection expérimentale de *C. gigas* (Saulnier, *et al.*, 2010), en testant *in vitro* l'hypothèse de l'existence d'un système de quorum sensing régulant aux niveaux intraspécifique (entre bactéries d'une même souche *V. splendidus*) et

interspécifique (entre souches *V. splendidus* et *V. aestuarianus*) la production et l'expression au niveau transcriptionnel des métalloprotéases Vsm et Vam. Deux gènes codant deux métalloprotéases ont été identifiés chez la souche *V. splendidus* LGP32 par séquençage complet et annotation du génome (Le Roux, *et al.*, 2009). La disponibilité d'une souche de *V. splendidus* mutante $\Delta\Delta$ Vsm509+2989 dont les parties centrales des gènes codant ces deux métalloprotéases ont été délétées (Binesse, *et al.*, 2008), constituait un outil de choix pour répondre à ces objectifs : en effet, le surnageant de cette souche mutée ne présentant plus aucune activité de type métalloprotéase, celui-ci a pu être utilisé comme milieu de culture ou « milieu conditionné » des souches sauvages de *V. splendidus* et *V. aestuarianus* afin de tester la présence ou l'absence d'autoinducteurs du quorum sensing. Les métalloprotéases des deux souches étudiées, *V. splendidus* et *V. aestuarianus* ont été quantifiées au niveau protéique, au moyen d'un test enzymatique spécifique, ainsi qu'au niveau transcriptionnel en détectant les transcrits Vsm et Vam respectivement.

Objectif

L'objectif de cette étude était d'explorer le phénomène de synergie observé en co-injection expérimentale en testant *in vitro* l'hypothèse de l'existence d'un système de quorum sensing régulant aux niveaux intraspécifique (*V. splendidus*) et interspécifique (*V. splendidus* / *V. aestuarianus*) la production et l'expression au niveau transcriptionnel des métalloprotéases Vsm et Vam des deux souches étudiées : l'effet du milieu conditionné sur l'induction de la production et de l'expression des métalloprotéases a été testé *in vitro* par mesure des activités de type métalloprotéase et par quantification relative des niveaux de transcrits des gènes Vsm et Vam en utilisant les suspensions bactériennes cultivées à différents temps en milieu conditionné. Dans un premier temps, les courbes de croissance et de production de métalloprotéase *in vitro* des deux souches modèles *V. splendidus* LGP32-GFP et *V. aestuarianus* 02/041 retenues pour cette thèse, ont été réalisées par dénombrement des colonies sur boîte et par PCR quantitative, dans les conditions utilisées pour la préparation des inocula dans l'ensemble de ces travaux.

Matériels et méthodes

Les souches utilisées

Les deux souches utilisées pour les co-infections expérimentales sont *V. splendidus* LGP32-GFP, correspondant à la souche LGP32 (Gay, *et al.*, 2004b) mutée afin d'exprimer une protéine fluorescente (Green Fluorescence Protein) (souche fournie par F. Le Roux) et *V. aestuarianus* 02/041 (Garnier, *et al.*, 2007). De plus, la souche $\Delta\Delta Vsm509+2989$, mutée également à partir de LGP32, a été utilisée pour les essais d'exploration de la synergie (Tableau 5).

Tableau 5 : Principales caractéristiques des souches utilisées.

Nom	Type	Contexte d'isolement	Production de métalloprotéase	Mutation	Intérêts de la mutation
<i>V. aestuarianus</i> 02/041	sauvage	en 2002, durant la période estivale, à partir d'hémolymphe d'huître prélevée dans l'écloserie d'Argenton	Oui	-	-
<i>V. splendidus</i> LGP32	sauvage	en 2001, dans un contexte de mortalité estivale d'huître creuse lors d'expérimentations réalisées en aquarium	Oui	-	-
<i>V. splendidus</i> LGP32-GFP	mutée à partir de LGP32		Oui	insertion d'un gène codant une GFP (Green Fluorescence Protein), ainsi qu'un gène codant une acétyl-transférase (CAT)	la GFP la rend détectable en microscopie à épifluorescence et quantifiable par PCR en temps réel, la CAT lui confère une résistance à un antibiotique, le chloramphénicol
<i>V. splendidus</i> $\Delta\Delta Vsm509+2989$	mutée à partir de LGP32	-	Non	délétion de la partie centrale des deux gènes codant deux métalloprotéases	ne présente plus aucune activité métalloprotéase et constitue donc un témoin d'intérêt pour nos expérimentations

Quantification de *V. splendidus* LGP32-GFP et *V. aestuarianus*

Préparation des cultures bactériennes et des échantillons

Les cultures bactériennes ont été préparées en ensemencant 7 mL de milieu Marine Broth avec trois colonies dans un tube de culture de 15 mL à bouchon hermétique. Les deux tubes ont alors été placés à 20°C pendant 24h sur un agitateur rotatif. Après 24h de culture, un étalement sur boîte de Marine Agar d'une dilution appropriée de la suspension a été réalisé afin de vérifier la concentration de la suspension (10^9 bactéries/mL théorique en phase de plateau). Pour la suite de l'expérience, la totalité des étapes réalisées pour les deux souches en parallèle (LGP32-GFP et 02/041) est représentée sur la Figure 34. Plusieurs points d'analyses sont effectués sur les suspensions réalisées dans des tubes à bouchon hermétique obtenues à différents temps de culture succédant au dépôt de l'inoculum bactérien (T0), à savoir 3h (T1), 5h (T2), 7h (T3), 9h (T4), 10h30min (T5), 12h (T6), 16h (T7), 20h (T8), 24h (T9), 45h (T10) et 141h30min (T11).

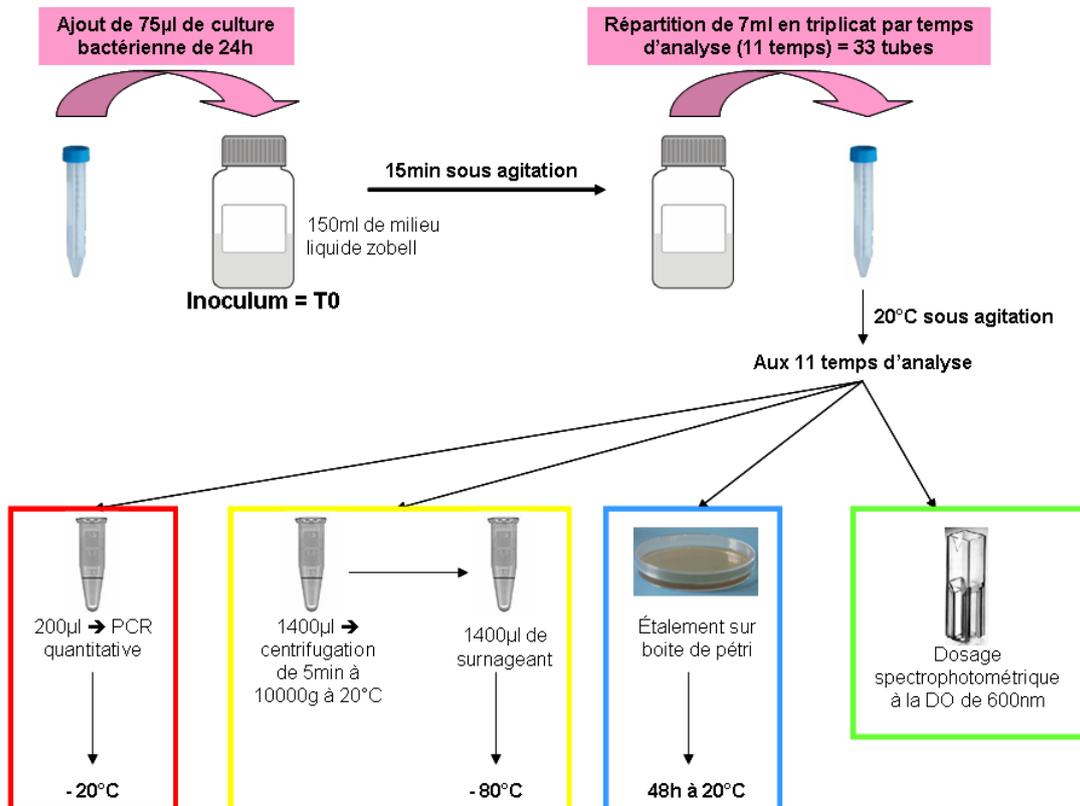


Figure 34 : Schéma représentant la préparation des cultures bactériennes pures et des échantillons pour la quantification des bactéries (encadré rouge) et pour la mesure de l'activité métalloprotéase (encadré jaune) : ce protocole a été suivi pour les deux souches bactériennes étudiées LGP32-GFP et 02/041.

Etablissement des courbes de croissance

- Dosages spectrophotométriques et comptages sur boîte

A chaque point d'analyse, une mesure spectrophotométrique a été réalisée en triplicat à l'aide du spectrophotomètre BioPhotometer d'Eppendorf à la DO de 600nm. Un étalement sur boîte de Pétri a également été réalisé pour une estimation de la concentration. Les courbes de croissance classiques ont alors été établies pour chaque souche bactérienne par représentation soit, de la densité optique (DO) soit des comptages des colonies sur boîte de culture en fonction de l'âge de la culture.

- Quantification des souches bactériennes par PCR quantitative

Des gammes étalons ont été réalisées pour chaque souche bactérienne, *V. splendidus* LGP32-GFP et *V. aestuarianus* 02/041, afin de quantifier les échantillons prélevés lors du suivi de croissance. Pour cela, des gammes de dilution de 10 en 10 ont été réalisées dans un volume de 1mL à partir de bouillons de culture en phase de plateau (de moins de 24 heures de concentration théorique connue, 10^9 bactéries par mL). Une estimation de la concentration de la suspension a été effectuée par la méthode classique du comptage sur boîte. Un volume de 900 μ L de suspension pour les différents points de la gamme de dilution a été centrifugé 5 minutes à 20°C à 10 000 g, les culots ont ensuite été repris dans 900 μ L d'H₂O Sigma et vortexés. L'extraction de l'ADN et sa dénaturation ont été réalisées sur un volume de 100 μ L de ces solutions qui ont été bouillies 10 minutes à 98°C : 5 μ l de ces échantillons ont été utilisés pour la PCR quantitative.

Ce protocole d'extraction a été appliqué de façon similaire aux échantillons de 200 μ L correspondant à l'étude de la croissance bactérienne et stockés à -20°C.

La quantification a été réalisée par PCR quantitative à l'aide d'une sonde marquée spécifique des souches utilisant la chimie Taqman (thermocycleur Mx3000P™ de Stratagene®). Les gènes ciblés sont le gène codant la GFP inséré par mutagenèse chez la souche *V. splendidus* LGP32-GFP (De Decker et Saulnier, submitted for publication) et le gène *dnaJ* d'intérêt phylogénétique (Nhung, *et al.*, 2007; Saulnier, *et al.*, 2009), concernant la souche *V. aestuarianus* 02/041 (Tableau 6). Un volume de 5 μ L d'ADN a été amplifié dans un volume réactionnel total de 25 μ L. Les concentrations finales des différents réactifs de la PCR sont les suivantes : 1X du Core PCR Buffer, MgCl₂ à 5mM, les dNTP à 0,8mM, les deux amorces à 300nM, la sonde à 200nM et la Hot start Taq polymérase utilisée à 0,05U/ μ L. La réaction d'amplification se déroule suivant ce profil thermique : dénaturation de l'ADN

à 95°C pendant 10 minutes suivie de 40 cycles à deux phases, 15 secondes à 95°C puis 90 secondes à 60°C.

Tableau 6 : Description des amorces et des sondes utilisées pour la quantification de *V. splendidus* LGP32-GFP et *V. aestuarianus* 02/041 en qPCR.

Souche	Gène ciblé	Séquences (5' –3') et fluorochromes	T _m (°C)	Taille des produits PCR (pb)
<i>V. aestuarianus</i> 02/041	<i>dnaJ</i>	Am. Sens Taqman GTATGAAATTTTAACTGACCCACAA	58	267
		Am. Anti -Sens Taqman CAATTTCTTTTCGAACAACCAC	59	
		Sonde Taqman Texas Red-TGGTAGCGCAGACTTCGGCGAC-BHQ2	71	
<i>V. splendidus</i> LGP32-GFP	gène de la GFP	Am. Sens Taqman TCAGTGGAGAGGGTGAAGGT	60	194
		Am. Anti -Sens Taqman TACATAACCTTCGGGCATGG	61	
		Sonde Taqman Cy5-TGTTCCATGGCCAACACTTGTC-A-BHQ1	68	

Mesure de l'activité de type métalloprotéase dans les surnageants de culture

Un volume de 500µL de surnageant de culture obtenu en milieu Zobell (Marine Broth) puis stocké à -80°C, a été utilisé pour mesurer l'activité métalloprotéase aux différents points de la courbe de croissance (Figure 34). Après avoir suivi le protocole schématisé Figure 35, 200µL de la solution finale ont été placés dans une microplaque de titration pour mesurer l'absorbance à 440nm, à l'aide d'un lecteur de plaque « Multiskan Ex » (Thermo electron Corporation) et du logiciel « Ascent Software V2.6 ».

En parallèle, différentes cultures bactériennes ont été préparées selon Denkin et Nelson (2004), afin de tester l'effet du surnageant de la souche mutée ΔΔVSM 509+2989 sur la production de métalloprotéase par la souche LGP32-GFP. Plusieurs culots bactériens obtenus après centrifugation d'une culture de 24h de la souche LGP32-GFP ont été repris dans deux types de milieux, le milieu classique Marine Broth (Zobell) et le milieu conditionné, surnageant d'une culture de 20h à 20°C de la souche mutée ΔΔVSM 509+2989 obtenu après centrifugation (à 3500g, 15 min) puis filtration à

0.22 μ m, ne présentant plus aucune activité de type métalloprotéase. Plusieurs culots bactériens obtenus après centrifugation d'une culture de 24h de la souche *V. splendidus* $\Delta\Delta$ Vsm509+2989 ont été repris dans du milieu classique Marine Broth (Zobell) et constituent les contrôles. A différents temps (0, 0.5h, 1h, 1.5h, 2h, 3h et 5h), des prélèvements sont réalisés dans les suspensions et les activités de type métalloprotéase sont mesurées dans les surnageants issues de ces suspensions. Les mesures d'activité sont effectuées sur trois replicats biologiques à chaque temps.

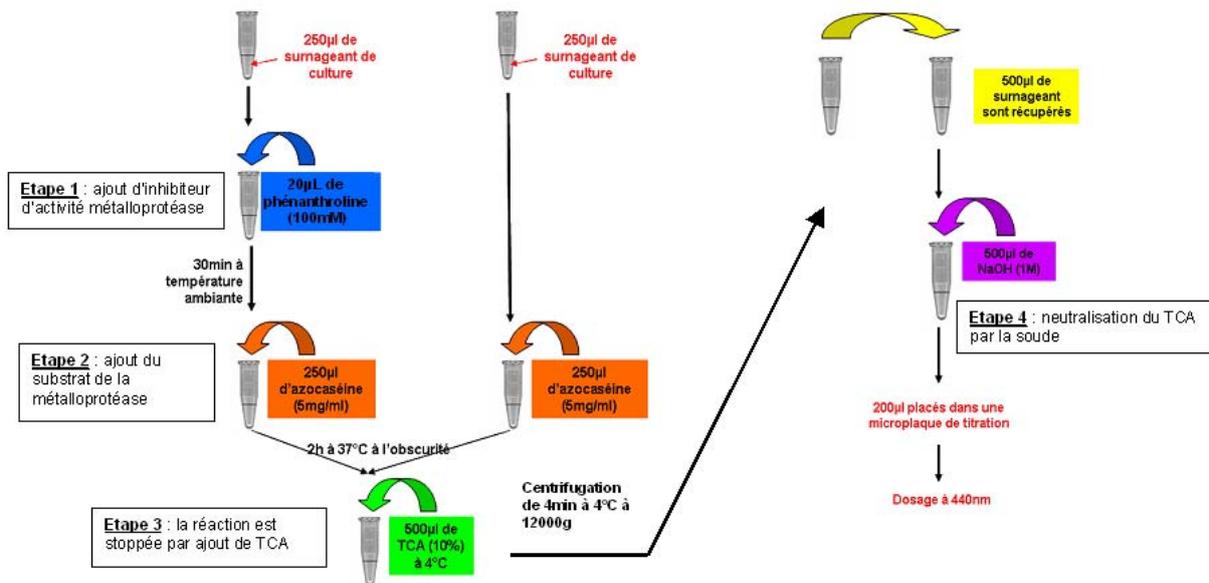


Figure 35 : Protocole de mesure de l'activité métalloprotéase dans les surnageants de culture. Azocaséine : concentration de 2,5mg/mL finale dans du Tris 50mM pH 8, TCA : Trichloroacétate 10%.

Quantification relative des transcrits des métalloprotéases de *V. splendidus* et *V. aestuarianus* par PCR en temps réel

Différentes cultures bactériennes ont été préparées selon Denkin et Nelson (2004), afin de tester l'effet du surnageant de la souche mutée $\Delta\Delta$ VSM 509+2989 sur la quantité des transcrits des gènes de métalloprotéases produite par les souches *V. splendidus* LGP32-GFP et *V. aestuarianus* 02/041. Un volume de 100mL de milieu conditionné a été préparé de la même façon que précédemment : il s'agit d'un surnageant d'une culture de 20h à 20°C de la souche mutée $\Delta\Delta$ VSM 509+2989 obtenu après centrifugation (à 3500g, 15 min) puis filtration à 0.22 μ m. Ce milieu conditionné, partitionné et utilisé comme milieu de culture (Vol = 7mL de milieu dans tubes hermétiques de 15mL), a étéensemencé par des inocula de *V. splendidus* LGP32-GFP et

V. aestuarianus 02/041, préparés à la concentration de 10^5 et 10^8 CFU/mL dans de l'eau de mer artificielle stérile (EMA).

Tableau 7 : Description des différents types d'échantillons d'ARNm étudiés issus de cultures pures de *V. splendidus* LGP32-GFP et de *V. aestuarianus* 02/041.

N° de l'éch.	Description
1	Suspensions bactériennes à 10^9 CFU/mL en Zobell après 20h d'incubation à 20°C
2	Inocula bactériens à 10^8 CFU/mL en EMA
3	Inocula bactériens à 10^5 CFU/mL en EMA
4	Culture en milieu Zobell (1h30 20°C) de l'inoculum de concentration 10^8 CFU/mL
5	Culture en milieu Zobell (1h30 20°C) de l'inoculum de concentration 10^5 CFU/mL
6	Culture en Milieu Conditionné (1h30 20°C) de l'inoculum de concentration 10^8 CFU/mL
7	Culture en Milieu Conditionné (1h30 20°C) de l'inoculum de concentration 10^5 CFU/mL

Pour chacune de ces deux souches, sept types d'extraits d'ARNm ont été réalisés à partir de 500µL de suspensions bactériennes additionnées avec 1mL de Bacteria Reagent (Qiagen), assurant l'intégrité des ARN bactériens (Tableau 7). Les cultures en milieu Zobell et en milieu conditionnéensemencés par les inocula ont été réalisées à 20°C durant 1h30.

Les conditions d'extraction des ARN bactériens, de la réaction de RT et de la qPCR utilisant des amorces spécifiques dessinées à partir des informations de séquences disponibles sur GenBank (Tableau 8), ont été optimisées et sont détaillées dans l'article 4 (Chapitre 3) (De Decker et Saulnier, submitted for publication). La validation des amplicons obtenus a été réalisée par vérification de la taille attendue sur gel d'agarose et par clonage puis séquençage des produits de PCR.

La quantification relative des niveaux de transcrits a simplement été réalisée par comparaison des Ct (cycle threshold) obtenus en PCR en temps réel.

Tableau 8 : Amorces utilisées pour la réaction de PCR ciblant spécifiquement les cDNA des métalloprotéases de *V. splendidus* LGP32 et *V. aestuarianus* 02/041.

Gène ciblé	Séquences (5' –3')	
<i>Vsm</i> <i>V. splendidus</i> LGP32-GFP	S-METVS2F	ACCTAAGCGGGAACCAATCT
	S-METVS2R	GGTAAGGGCGACAGTCGTAA
<i>Vam</i> <i>V. aestuarianus</i> 02/041	S-METVA2F	CAAACCTTGGGAAGGCTTGAA
	S-METVA2R	GACCGTTTTTCACCGCACTAT

Résultats

1. Courbes de croissance de *V. splendidus* LGP32-GFP et *V. aestuarianus* 02/041

- Dosages spectrophotométriques

L'évolution de la densité optique (DO) au cours du temps présente des profils différents en fonction de la bactérie, bien que les conditions de culture soient strictement identiques (Figure 36). En effet, l'augmentation de la DO est moins rapide chez *V. aestuarianus* que *V. splendidus*. A titre d'exemple, après 9h de croissance, *V. aestuarianus* présente une DO de seulement 0,08 alors que celle de *V. splendidus* est de 0,97. D'autre part, *V. aestuarianus* et *V. splendidus* présentent des valeurs de DO de 0,8 et 1,2 respectivement lors de la phase d'optimum de croissance (Figure 36). L'ouverture du tube à 45h et l'entrée d'air qui en résulte, entraînent une augmentation de la DO, qui est de 1 et 1,8 pour 02/041 et LGP32-GFP respectivement, lors de la phase de plateau après 6 jours de culture à 20°C, tandis que les croissances bactériennes sans renouvellement d'air tendent à décroître.

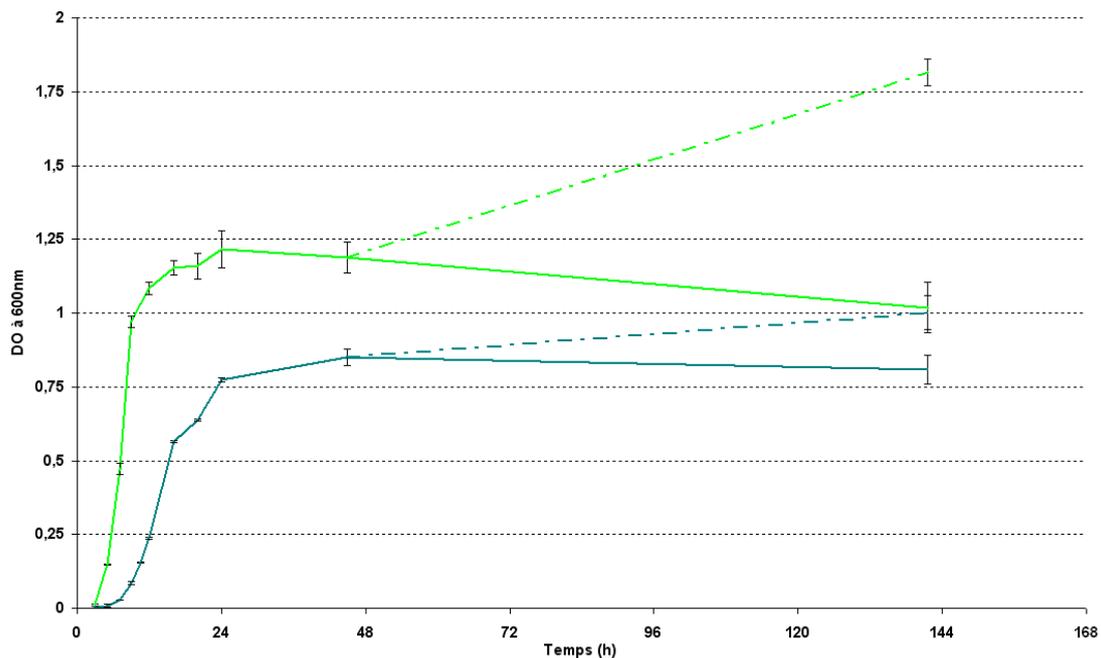


Figure 36 : Cinétiques de croissance de *V. splendidus* LGP32-GFP (en vert plein) et *V. aestuarianus* 02/041 (en bleu plein) établies à partir des dosages spectrophotométriques réalisés aux différents temps d'incubation. Les courbes représentées en pointillés représentent les cinétiques de croissance observées dans les tubes dont l'air a été renouvelé par ouverture en condition stérile à 45h.

- Quantification des souches bactériennes par comptages sur boîte de culture et par PCR quantitative

L'évolution des concentrations obtenues par la technique des comptages sur boîte montre des résultats similaires entre les deux espèces, jusqu'à la phase de plateau (45h) (Figure 37). A la fin du suivi de croissance (sans renouvellement de l'air, à 141h de culture), on observe des concentrations très différentes entre les deux souches, LGP32-GFP à $3.3 \cdot 10^6$ UFC/mL et 02/041 à $1,7 \cdot 10^9$ UFC/mL. La linéarité quasi-parfaite de la cinétique de croissance des bactéries durant la phase exponentielle nous a permis de calculer le temps de génération des deux souches, correspondant au temps de division des cellules bactériennes. Ainsi les temps de génération de *V. splendidus* et *V. aestuarianus* sont respectivement de 41 minutes et 60 minutes. Alors que la concentration de *V. aestuarianus* mesurée en nombre de colonies sur boîte de culture se maintient jusqu'à 6 jours de culture (144h), celle de *V. splendidus* chute d'environ 2 log.

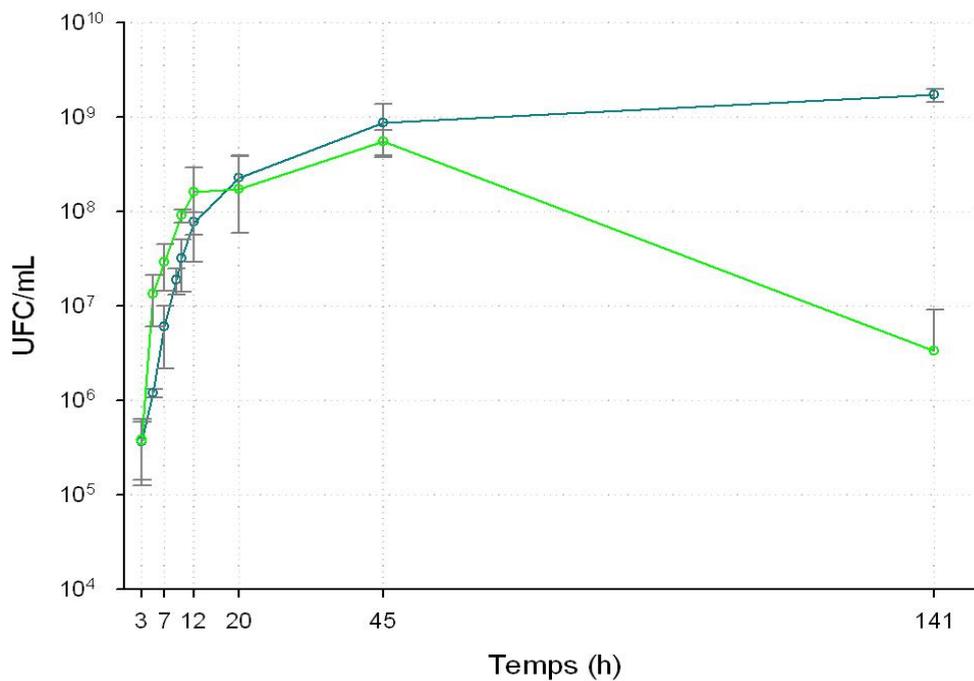


Figure 37 : Cinétiques de croissance de *V. splendidus* LGP32-GFP (en vert) et *V. aestuarianus* 02/041 (en bleu) établies à partir des concentrations bactériennes estimées par dénombrement des colonies sur boîtes de culture.

Les deux gammes réalisées en triplicat pour la quantification par PCR quantitative de *V. splendidus* LGP32-GFP et *V. aestuarianus* 02/041 sont représentées sur la Figure 38 : les

coefficients de corrélation r^2 et les efficacités obtenus sont respectivement de 0.9967 et 103.9% pour la gamme *V. splendidus* LGP32-GFP et 0.9976 et 103.6% pour la gamme *V. aestuarianus* 02/041.

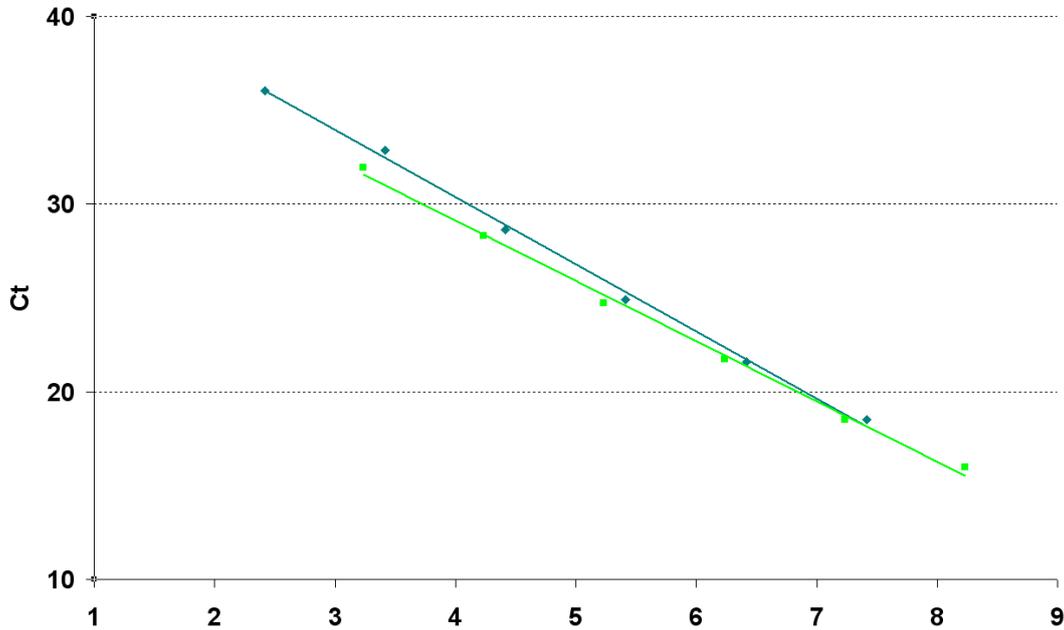


Figure 38 : Gammes utilisées pour la quantification de *V. splendidus* LGP32-GFP (en vert plein) et *V. aestuarianus* 02/041 (en bleu plein) réalisées en triplicat. Les concentrations sont représentées en nombre de génomes équivalents UFC (log) présents dans l'échantillon initial.

Les deux courbes obtenues par PCR quantitative (Figure 39) sont relativement semblables à celles obtenues par la méthode de bactériologie classique utilisée précédemment. On note cependant que l'estimation de la concentration par PCR en nombre de génomes équivalent UFC ne rend évidemment pas compte de la chute précédemment décrite observée dans les cultures de *V. splendidus* de 6 jours.

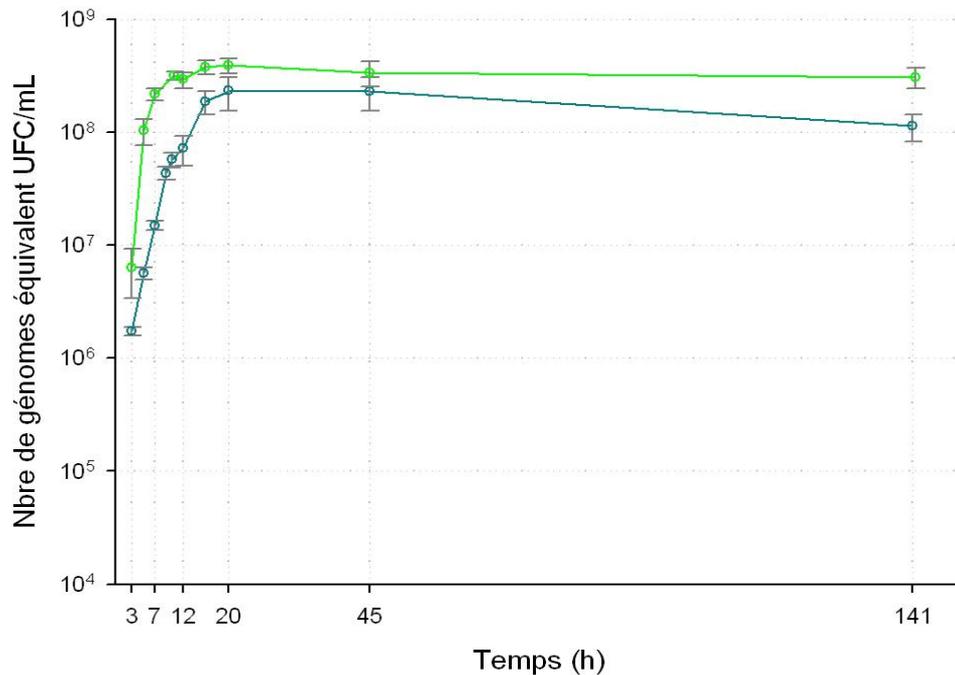


Figure 39 : Cinétiques de croissance de *V. splendidus* LGP32-GFP (en vert) et *V. aestuarianus* 02/041 (en bleu) établies à partir des concentrations bactériennes estimées par PCR quantitative.

2. Mesure de l'activité métalloprotéase dans les surnageants de culture

- Dans le milieu de culture Marine Agar

La production de métalloprotéase n'est détectable qu'après 12h de culture (0 unité/mL) pour les deux bactéries et plus spécialement à 16h, où des productions de métalloprotéase de 82 unités/mL et de 25 unités/mL sont observables pour 02/041 et LGP32-GFP respectivement (Figure 40). Cependant, la production de métalloprotéase est différente en fonction de la souche. En effet, à la phase de plateau (à 45h), *V. aestuarianus* (177 unités/mL) produit environ quatre fois plus de métalloprotéase que *V. splendidus* (41 unités/mL). Après 24h de culture, la production de métalloprotéase de LGP32-GFP est quasi stable, alors que celle de 02/041 diminue fortement. Il est notable que cette production est dépendante des conditions de culture. En effet, suite au changement d'air effectué à 45h dans le tube de culture (ouverture du tube), une augmentation notable de la production de métalloprotéase est observée concernant LGP32-GFP et une stabilité de production en ce qui concerne 02/041.

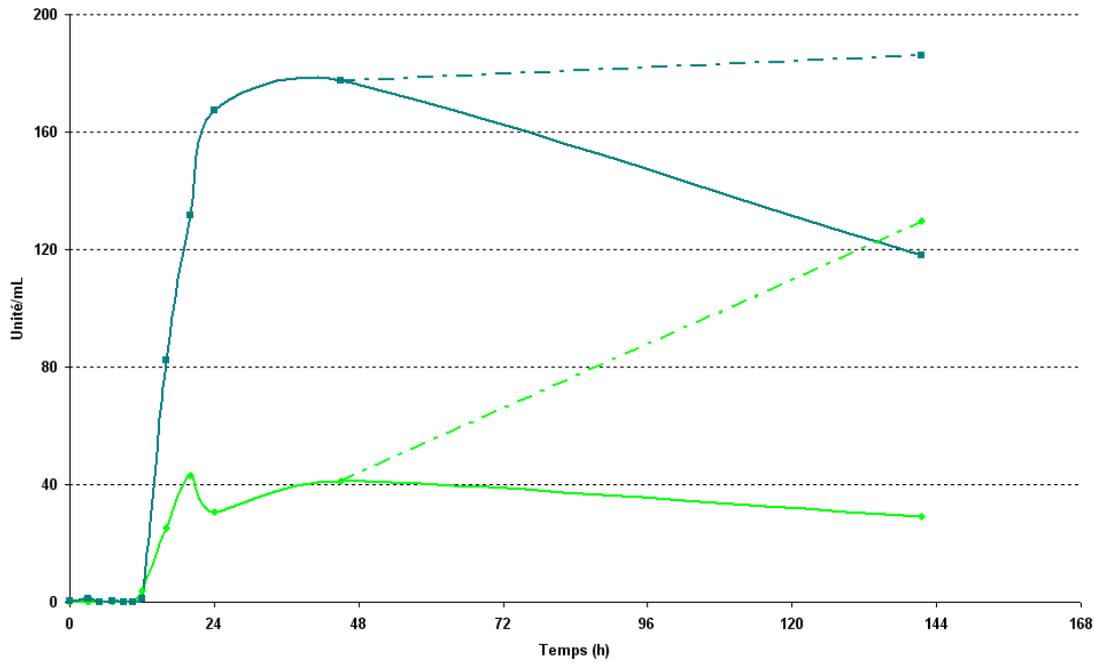


Figure 40 : Cinétiques des activités de type métalloprotéase mesurées dans les surnageants de *V. splendidus* LGP32-GFP (en vert plein) et *V. aestuarianus* 02/041 (en bleu plein). Les courbes représentées en pointillées représentent les cinétiques des activités mesurées dans les tubes dont l'air a été renouvelé par ouverture en condition stérile à 45h. 1 unité protéase = quantité d'enzyme provoquant une augmentation de l'absorbance de 0.01.

- Dans le milieu conditionné

Les effets de milieux de culture différents sur l'initiation de la production de métalloprotéase de la souche *V. splendidus* LGP32-GFP ont été étudiés, en utilisant soit du milieu Marine Broth soit le milieu conditionné (surnageant de culture de 24h issu de la souche déficiente en métalloprotéase $\Delta\Delta Vsm509+2989$, cf. Tableau 5). L'absence de production de métalloprotéase par cette dernière souche mutée a été vérifiée. Seule la souche LGP32-GFP cultivée en milieu conditionné présente une activité métalloprotéase qui est détectée dès 3h d'incubation (Tableau 9).

Tableau 9 : Mesure de l'activité de type métalloprotéase dans le surnageant au cours de cultures de LGP32-GFP et $\Delta\Delta Vsm509+2989$ en milieu classique Marine Broth et milieu conditionné. La détection d'une activité métalloprotéase est schématisée par une case de couleur jaune. Les cases de couleur grise spécifient qu'aucune activité métalloprotéase n'a été mesurée dans les conditions décrites.

$\Delta\Delta Vsm509+2989$ Marine Broth : culot bactérien de la souche mutante $\Delta\Delta Vsm509+2989$ au plateau repris dans du milieu Marine Broth ;

LGP32-GFP Marine Broth : culot bactérien de la souche LGP32-GFP au plateau repris dans du milieu Marine Broth ;

LGP32-GFP Milieu conditionné : culot bactérien de la souche LGP32-GFP au plateau repris dans du surnageant de la souche mutante $\Delta\Delta Vsm509+2989$.

Age de la culture (h)	$\Delta\Delta Vsm509+2989$ Marine Broth	LGP32-GFP Marine Broth	LGP32-GFP Milieu conditionné
0			
0,5			
1			
1,5			
2			
3			
5			

3. Quantification relative des transcrits des métalloprotéases Vsm et Vam par PCR

Les courbes d'efficacité des réactions d'amplification des cDNA de Vsm et Vam par qPCR présentent des coefficients de corrélation r^2 et des efficacités respectivement de 0.952 et 99.3% pour la réaction amplifiant les cDNA issus des transcrits de Vsm, et de 0.998 et 103.7% pour la réaction amplifiant les cDNA issus des transcrits de Vam. Les quantifications relatives des niveaux de transcrits de métalloprotéase obtenues dans les 7 échantillons précédemment décrits (Tableau 7 réinséré ci-dessous pour rappel pratique) sont représentées Figure 41 et Figure 42. Par soucis de clarté, l'axe des abscisses représente un facteur d'expression, appelé F et calculé de la façon suivante :

$F = 40 - Ct$ obtenu en PCR. Les mesures ont été réalisées en triplicats.

Tableau 7 : Description des différents types d'échantillons d'ARNm étudiés issus de cultures pures de *V. splendidus* LGP32-GFP et de *V. aestuarianus* 02/041.

N° de l'éch.	Description
1	Suspensions bactériennes à 10^9 CFU/mL en Zobell après 20h d'incubation à 20°C
2	Inocula bactériens à 10^8 CFU/mL en EMA
3	Inocula bactériens à 10^5 CFU/mL en EMA
4	Culture en milieu Zobell (1h30 20°C) de l'inoculum de concentration 10^8 CFU/mL
5	Culture en milieu Zobell (1h30 20°C) de l'inoculum de concentration 10^5 CFU/mL
6	Culture en Milieu Conditionné (1h30 20°C) de l'inoculum de concentration 10^8 CFU/mL
7	Culture en Milieu Conditionné (1h30 20°C) de l'inoculum de concentration 10^5 CFU/mL

La Figure 41 rend compte des quantifications relatives des niveaux de transcrits mesurés dans les cultures réalisées dans les conditions classiques d'utilisation, à savoir un milieu Zobell pour une culture de 20h à 20°C. On remarque tout d'abord que les niveaux d'expression obtenus dans la culture de *V. aestuarianus* 02/041 sont environ 1000 fois supérieurs à ceux obtenus dans les cultures de *V. splendidus* LGP32-GFP réalisées dans les mêmes conditions. De plus, la remise en suspension dans de l'eau de mer artificielle stérile des culots bactériens de ces cultures après centrifugation et élimination du surnageant de culture entraîne une diminution immédiate d'un facteur d'environ 100 et 10 de la quantité de transcrits mesurés respectivement pour *V. splendidus* LGP32-GFP et *V. aestuarianus* 02/041. Aucun transcrit n'est détecté dans les inoculats dilués 100 fois, inoculats utilisés pour ensemercer les cultures dont sont issus les échantillons 4 à 7.

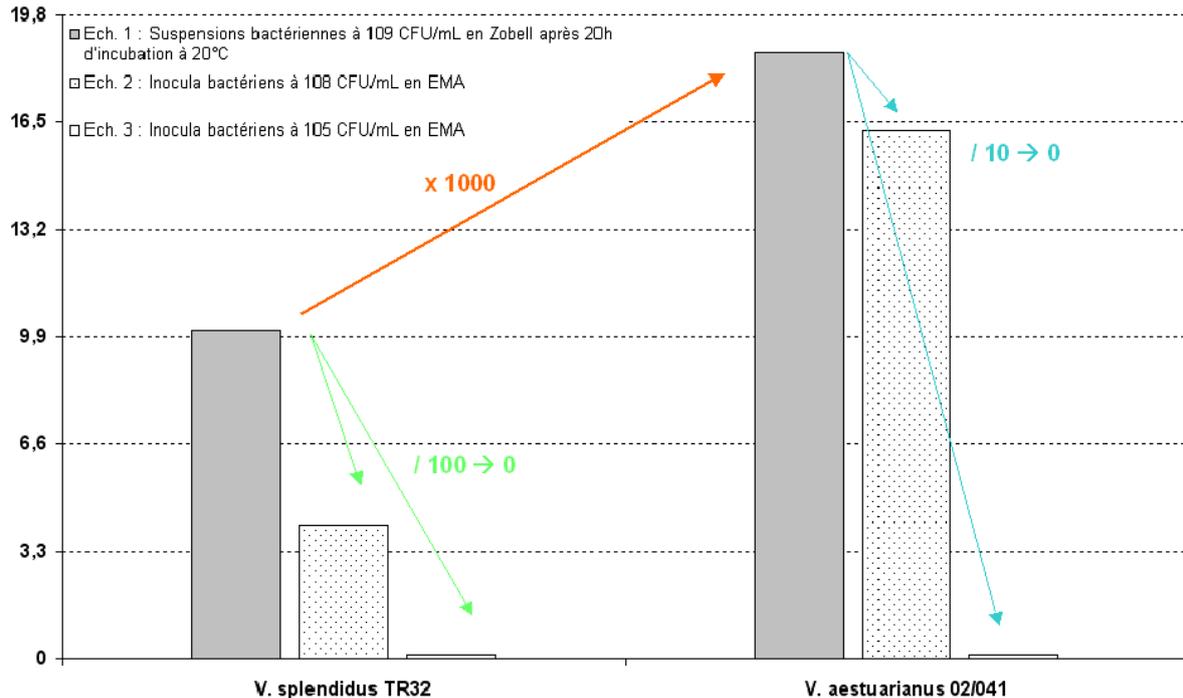


Figure 41 : Facteurs d'expression des gènes Vsm et Vam obtenus dans les échantillons 1 à 3 pour les deux souches étudiées. Le facteur d'expression F calculé de la façon suivante, $F = 40 - Ct$ obtenu en qPCR, est représenté sur l'axe des abscisses. Une augmentation ou diminution de 3,3 en facteur d'expression correspond à 10 fois plus ou 10 fois moins de quantité de transcrits respectivement.

La Figure 42 rend compte des quantifications relatives des niveaux de transcrits mesurés dans les culturesensemencées par les inoculats précédemment décrits et réalisées dans du milieu Zobell ou du milieu conditionné durant 1h30 à 20°C. Il apparaît clairement un effet du milieu conditionné sur les niveaux d'expression relative mesurés. En effet, le niveau d'expression obtenu dans la culture de *V. splendidus* LGP32-GFP réalisée dans le milieu conditionné est environ 10 fois supérieur à celui obtenu dans la culture de *V. splendidus* LGP32-GFP réalisée dans le milieu Zobell lorsqu'un inoculum de 10⁸ CFU/mL est utilisé. Cet effet est plus prononcé pour *V. aestuarianus*, puisqu'on observe un niveau d'expression obtenus dans la culture de *V. aestuarianus* 02/041 réalisée dans le milieu conditionné environ 100 fois supérieur à celui obtenu dans la culture de *V. aestuarianus* 02/041 réalisée dans le milieu Zobell. Enfin, alors qu'aucun transcrit Vam de *V. aestuarianus* 02/041 n'est détecté dans la culture Zobellensemencée par l'inoculum de concentration 10⁵ UFC/mL, l'expression de ce gène semble être induite à cette concentration d'inoculum dans la culture réalisée en milieu conditionné. Cet effet n'est pas observé pour *V. splendidus* LGP32-GFP.

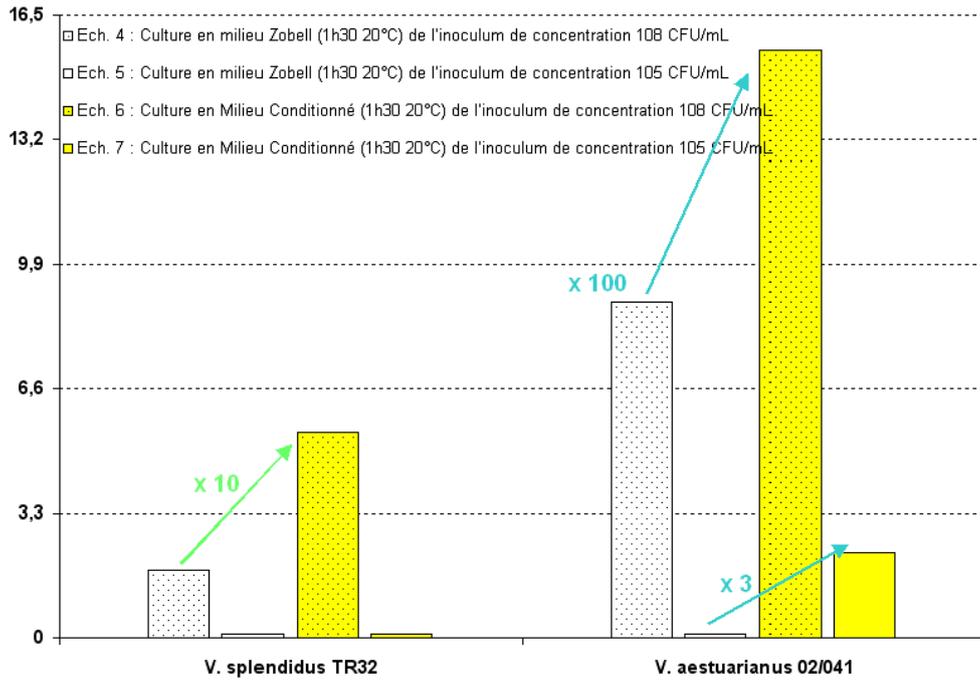


Figure 42 : Facteurs d'expression des gènes Vsm et Vam obtenus dans les échantillons 4 à 7 pour les deux souches étudiées. Le facteur d'expression F calculé de la façon suivante, $F = 40 - Ct$ obtenu en PCR, est représenté sur l'axe des abscisses. Une augmentation ou diminution de 3,3 en facteur d'expression correspond à 10 fois plus ou 10 fois moins de quantité de transcrits respectivement.

Discussion et perspectives

1. Cinétique de croissance *in vitro* des deux souches modèles

Les dosages spectrophotométriques, les comptages sur boîte ainsi que la quantification par PCR quantitative nous ont permis de construire trois courbes de croissance pour les deux souches de *Vibrio* étudiées. Ces courbes suggèrent toutes que *V. splendidus* LGP32-GFP et *V. aestuarianus* 02/041 présentent des courbes de croissance légèrement différentes dans nos conditions de culture *in vitro*. Le temps de division cellulaire de *V. aestuarianus* (environ 60 minutes) est 1.5 supérieur à celui de *V. splendidus* (environ 40 minutes). A 24h de culture, les deux souches atteignent un plateau à des concentrations similaires (entre 10^8 et 10^9 UFC/mL). Parmi les facteurs d'inhibition de la croissance, comme l'encombrement stérique des souches et l'appauvrissement du milieu, l'absence d'oxygène semble être le facteur le plus limitant (cf. infra).

Par ailleurs, le différentiel de DO observé au plateau entre les deux souches *V. splendidus* et *V. aestuarianus* (respectivement de 1.2 et 0.8 environ) peut être expliqué par le fait que ces deux souches présentent des morphologies différentes, comme révélées par des études de cytométrie en flux, influençant probablement les propriétés optiques de ces deux souches. Enfin, les cinétiques de croissance établies par les deux méthodes de quantification utilisées, dénombrement sur boîte de culture et PCR quantitative sont concordantes. Il est intéressant de noter la plus grande précision obtenue en PCR quantitative, les écart-types entre triplicats biologiques étant très faibles comparés à ceux obtenus par la méthode classique de comptage sur boîte. En effet, cette méthode de comptage par étalement sur milieu gélosé implique de nombreuses manipulations de laboratoire (gammes de dilution, nombreux pipetages, ...) qui induisent une accumulation de biais techniques à l'origine de cette variabilité.

Enfin, à 141h une diminution nette (d'un facteur d'environ 2 log) de la concentration de *V. splendidus* LGP32-GFP par la technique de comptage sur boîte a été observée par comparaison à la technique de quantification par PCR quantitative. En effet, les quantifications obtenues à partir d'ADN bactériens restent stables. Ceci peut s'expliquer i. soit par le fait que la PCR quantitative permet de détecter non seulement les bactéries viables mais également les bactéries « mortes » présentant un matériel génomique encore intègre et donc amplifiable par PCR, ii. soit par l'hypothèse de changement d'état des cellules de *V. splendidus* LGP32-GFP qui seraient alors viables mais non cultivables (VNC) à ce temps tardif en raison d'un probable stress de culture induit par un temps d'incubation prolongé. Cette hypothèse d'état viable mais non cultivable est privilégiée par comparaison des résultats de quantification obtenus chez *V. aestuarianus*. En effet, aucune différence

significative entre les deux méthodes de quantification n'est observée chez cette dernière souche, suggérant l'implication de processus physiologiques différents entre ces deux souches dans ces conditions de culture tardive supposées non-optimales.

Même si les techniques de PCR mises au point dans ces travaux apportent de nombreuses satisfactions (spécificité, sensibilité, rapidité, détection des formes VNC, ADN plus stable qu'ARN), il pourrait être envisagé d'évaluer d'autres techniques de quantification chez les souches utilisées dans le cadre de ce travail, comme celles ciblant certains ARN. En effet, les techniques ciblant l'ADN présupposent que cet ADN est rapidement dégradé après la mort cellulaire des bactéries. Cependant, la corrélation entre présence d'ADN et viabilité cellulaire s'est révélée parfois faible, et l'ADN peut persister après la mort cellulaire (Hellyer, *et al.*, 1999; Sheridan, *et al.*, 1999). Différentes méthodes sont disponibles pour pallier ce problème technique. Le ciblage de longs fragments a d'abord été expérimenté, car cela réduit la fréquence de détection par PCR de fragments déjà dégradés suite à la mort cellulaire (McCarty et Atlas, 1993). Cependant, les ARN étant dégradés beaucoup plus rapidement que l'ADN du fait de leur demi-vie de quelques minutes seulement, l'approche la plus pertinente est probablement la quantification de plusieurs cibles ARN (Sheridan, *et al.*, 1998; McKillip, *et al.*, 1999; Villarino, *et al.*, 2000). Différentes techniques peuvent être utilisées telles que la technique de Reverse Transcriptase (RT)-PCR, la méthode NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) (Chan et Fox, 1999; Simpkins, *et al.*, 2000) mais également une méthode dite RT-SDA (pour reverse transcriptase strand displacement amplification) (Hellyer, 2001). Ces techniques sont cependant difficiles à appliquer dans la mesure où elles ciblent l'ARN peu stable et nécessitent notamment la mise au point de protocoles d'extraction d'ARN optimaux, vis-à-vis notamment des bactéries VNC dont l'ARN est plus difficile à extraire, et la validation d'amorces s'hybridant sur des ADNc pertinents.

Ainsi, cette étude des croissances *in vitro* nous a permis de caractériser avec précision les concentrations des cultures utilisées tout au long de ce travail de thèse et de les standardiser. Ce travail était d'autant plus important qu'il convenait de documenter avec précision les caractéristiques (concentration et viabilité bactériennes) des inocula utilisés par injection lors des infections expérimentales de *C. gigas*.

2. Croissance et activité métalloprotéase modulées par un facteur abiotique

A 45h d'incubation, une série de tube a été ouverte puis refermée, afin de renouveler l'air des tubes, puis à nouveau incubée à 20°C sous agitation. Cette aération a induit une importante

augmentation de DO pour les deux souches traduisant une stimulation de la croissance bactérienne. En effet, la plupart des *Vibrio* étant des bactéries aéro-anaérobie facultatives, un apport d'oxygène stimule de ce fait leur métabolisme et peut provoquer alors une augmentation de la croissance. Ces résultats suggèrent que la croissance bactérienne est fortement dépendante des conditions de culture et *a fortiori* des paramètres environnementaux. Ces courbes de croissance sont donc spécifiques des conditions de culture utilisées. Une variation dans ces conditions entraînera obligatoirement une modification dans ces cinétiques.

De même, la production de métalloprotéase est fortement influencée par ce renouvellement d'air dans les tubes de culture. En effet, l'activité métalloprotéase produite par *V. splendidus* LGP32-GFP augmente de 30 unités/mL (activité observée dans les conditions normales de culture) à 130 unités/mL. L'activité métalloprotéase produite par *V. aestuarianus* 02/041 en condition normale de culture est d'environ 120 unités/mL, alors que celle observée suite à l'aération est d'environ 185 unités/mL. Ceci suggère également l'importance des facteurs environnementaux dans la modulation de la production de ce facteur de virulence. De plus, il est intéressant de noter qu'en condition normale de culture, la production de métalloprotéase de *V. aestuarianus* 02/041 est plus de quatre fois supérieure à celle de *V. splendidus* LGP32-GFP à 45h, avec respectivement des activités de 180 unités/mL et 40 unités/mL.

Ces résultats issus d'expérimentations *in vitro* ouvrent de nombreuses perspectives visant notamment la caractérisation des conditions de modulation des croissances bactériennes et de la production de métalloprotéase *in vivo*. Il serait intéressant d'étudier l'effet de différents facteurs abiotiques sur la modulation *in vitro* de la croissance et surtout de l'activité métalloprotéase, comme par exemple l'oxygène dissous ou la température (Hare, *et al.*, 1981), mais également sur la pathogénicité de ces souches, cultivées dans des conditions particulières, par infection expérimentale de *C. gigas*. De plus, il serait intéressant d'envisager des expériences similaires (croissance et production de métalloprotéase) dans des milieux non synthétiques se rapprochant des conditions *in vivo*, comme par exemple des broyats d'huîtres ou de l'hémolymphe. Enfin, l'étude de facteurs internes propres à l'huître susceptibles de moduler la production de métalloprotéase, comme par exemple la concentration en fer disponible, un élément essentiel à la croissance de nombreux vibrions, ou encore le zinc, constitutif de l'hème des métalloprotéases, permettrait de documenter les conditions de modulation de ce facteur de virulence *in vivo* (Guiney, 1997; Cotter et Miller, 1998).

3. La métalloprotéase, un facteur de virulence contrôlé chez les deux souches modèles par un phénomène de quorum sensing

Il est particulièrement intéressant de noter qu'une activité métalloprotéase n'est détectée dans nos conditions de culture qu'à partir de 16h d'incubation chez les deux souches étudiées. Ce résultat suggère que la production de ce facteur de virulence est densité-dépendante laissant présager de l'existence d'un phénomène de quorum sensing. En effet, ce phénomène est un mécanisme dans lequel les bactéries coordonnent l'expression de certains gènes en réponse à leur densité de population en produisant et libérant dans le milieu extracellulaire de petites molécules signal appelées autoinducteurs. Les phénotypes contrôlés par un système de quorum sensing comprennent notamment l'expression de facteurs de virulence : le quorum-sensing d'organismes pathogènes augmenterait probablement leur chance d'infecter avec succès leur hôte en retardant la production de facteur de virulence jusqu'à ce que la densité de population soit assez importante pour résister efficacement aux mécanismes de défense de l'hôte (Defoirdt, *et al.*, 2004). Cette activation de la production de métalloprotéase induite à de fortes densités cellulaires a été observée chez différentes espèces de *Vibrio* (Jobling et Holmes, 1997; Shao et Hor, 2001; Zhu, *et al.*, 2002), suggérant un rôle important de ce facteur de virulence dans les dernières étapes de l'interaction hôte-*Vibrio* pathogènes (Mok, *et al.*, 2003).

L'approche *in vitro* utilisée pour tester l'hypothèse de l'existence d'un système de quorum sensing régulant la production et l'expression des métalloprotéases Vsm et Vam des deux souches étudiées est directement inspirée des travaux de Denkin et Nelson (2004). L'utilisation de la souche mutée *V. splendidus* $\Delta\Delta$ Vsm509+2989 nous a permis d'obtenir un surnageant utilisé comme milieu de culture conditionné ne présentant aucune activité métalloprotéase mais contenant hypothétiquement les autoinducteurs, molécules médiatrices du quorum sensing.

Ainsi, il a tout d'abord été mis en évidence une induction précoce de la production de métalloprotéase dans des cultures de 3h de *V. splendidus* LGP32-GFP en milieu conditionné alors qu'elle n'est pas détectée dans un milieu classique de culture même 5h post incubation. Ce résultat suggère la présence de molécules autoinductrices dans le surnageant de la souche *V. splendidus* $\Delta\Delta$ Vsm509+2989 et donc d'une modulation probable de la production de ce facteur de virulence à un niveau intraspécifique par le quorum sensing. Il aurait été intéressant de poursuivre ce suivi quelques heures jusqu'à la détection d'une activité métalloprotéase dans le milieu classique de culture. Par ailleurs, les quantifications relatives des niveaux de transcrits de Vsm et Vam mesurées dans les différentes conditions de culture corroborent cette hypothèse : en effet, il est clairement observé une surexpression au niveau transcriptionnel de ces deux gènes de facteurs 10 et 100 respectivement dans des suspensions de 1h30 de *V. splendidus* LGP32-GFP et *V. aestuarianus* 02/041 réalisées dans le

milieu de culture conditionné. De la même façon, ces résultats suggèrent l'implication d'un système de quorum sensing dans la modulation de l'expression de ces facteurs de virulence et ce, aux niveaux intraspécifique mais également interspécifique. Ce type d'interaction *via* un système de communication intracellulaire commun aux deux espèces étudiées pourrait participer au phénomène de synergie mis en évidence entre ces deux *Vibrio* pathogènes de l'huître creuse. Cette collaboration *in vitro* entre ces deux pathogènes, dont l'un favorise et amplifie la production ou l'expression d'un facteur de virulence de l'autre, soulève de nombreuses questions et perspectives. Il conviendrait dans un premier temps d'étendre ces approches à des études *in vivo*. En effet, ces travaux ont été réalisés dans des conditions de culture pure : il serait très intéressant de les analyser au regard de la complexité de la flore microbienne endogène de l'huître creuse, au sein de laquelle on peut imaginer des interactions de compétition ou de collaboration bactériennes, activatrices mais également inhibitrices (Duan, *et al.*, 2003).

Enfin, le développement d'un outil spécifique de quantification *in situ* des protéines métalloprotéases, de type test ELISA, permettrait de documenter le rôle des métalloprotéases de ces deux *Vibrio* pathogènes dans le processus infectieux chez *C. gigas*. Ces analyses développées à l'échelle tissulaire au cours d'une infection expérimentale et couplées à une quantification des cellules bactériennes et des transcrits de métalloprotéases *in situ* apporteraient énormément dans la description de la pathogenèse et du rôle de ce facteur clé de virulence dans celle-ci.

CHAPITRE 2

FACTEURS DE SENSIBILITE DE L'HUITRE CREUSE

A UNE VIBRIOSE EXPERIMENTALE :

GAMETOGENESE, PLOÏDIE ET COMPOSANTE GENETIQUE.

Sommaire du Chapitre 2

1	Article 3 :	189
	Responses of diploid and triploid Pacific oysters <i>Crassostrea gigas</i> to <i>Vibrio</i> challenge in relation to their reproductive status.	
2	Résultats annexes:	231
	Résistance et Génétique.	

Introduction générale

L'infection expérimentale constitue un outil de choix pour des approches multidisciplinaires appliquées à l'étude de maladies infectieuses. Qu'elle vise l'étude de facteurs de l'hôte ou de facteurs de l'agent pathogène, la reproduction d'une maladie par cette approche expérimentale permet de comparer l'effet de conditions contrastées sur la réponse de l'hôte, sur les cinétiques d'infection et les survies finales observées. De nombreux modèles d'infection expérimentale sont utilisés pour l'étude de maladies virales, parasitaires ou bactériennes touchant des organismes aquacoles. Ils permettent notamment de tester l'effet de différents types de traitements thérapeutiques (Villamil, *et al.*, 2003; Arijó, *et al.*, 2005), d'évaluer la virulence de collection de souches isolées au cours d'épisodes de mortalité (Gay, 2004; Goarant, *et al.*, 2006b; Saulnier, *et al.*, 2010), de tester les modes de transmission (Lallias, *et al.*, 2008; Schott, *et al.*, 2008), de décrire la pathogenèse (Elston et Leibovitz, 1980; Løvoll, *et al.*, 2009), d'évaluer les performances de survies de familles sélectionnées pour leur résistance à un agent pathogène (Gomez-Leon, *et al.*, 2008; Goyard, *et al.*, 2008; Dégremont, *et al.*, 2010) ou encore d'explorer des facteurs de l'hôte en relation avec sa sensibilité à une infection expérimentale (Goarant, *et al.*, 1998; Labreuche, *et al.*, 2006a; Lallias, *et al.*, 2008; Travers, *et al.*, 2008). Cet outil d'infection expérimentale peut donc servir des objectifs multiples pour l'exploration de différents types d'interactions liant les trois compartiments, hôte, agent pathogène et environnement. De plus, cet outil permet d'approcher différents niveaux d'intégration : moléculaire, cellulaire, tissulaire, individuel, familial ou populationnel. Ainsi, la standardisation des protocoles d'infection expérimentale est nécessaire si l'on veut optimiser l'apport de cet outil intégratif qui reste souvent difficile et long à mettre en œuvre. De même, l'optimisation de cet outil implique l'ajustement de ses modalités aux objectifs visés, au plan analytique prévu et aux caractéristiques biologiques des hôtes et des agents pathogènes impliqués.

Ainsi, plusieurs protocoles d'infection expérimentale, par balnéation, injection et cohabitation ont été testés au cours de cette thèse afin de répondre à des objectifs différents :

1/ Au commencement de ce travail de thèse et dans le but de décrire la pathogenèse, des essais d'infection expérimentale non invasive par balnéation ont été entrepris à plusieurs reprises sur des huîtres hors gamétogenèse active, mais aucun de ces essais n'avait jusqu'alors permis l'induction de mortalités reproductibles. Un essai d'infection expérimentale par balnéation a été réalisé dans un deuxième temps sur des animaux présentant des stades de reproduction contrastés et a permis l'induction de mortalité : ce résultat est présenté dans l'article 3.

2/ Par ailleurs, un modèle de co-infection expérimentale reproductible par injection réalisé à 20°C a été mis au point pour des objectifs axés sur l'étude de l'influence de différents facteurs de l'huître sur sa réponse à une vibriose expérimentale (Saulnier, *et al.*, 2010). Pour ce faire, les deux *Vibrio* pathogènes étudiés, *V. splendidus* LGP32-GFP et *V. aestuarianus* 02/041, ont été injectés simultanément dans le muscle adducteur d'huîtres creuses anesthésiées. Même si ce protocole par injection ne reproduit pas le phénomène naturel d'infection et court-circuite notamment les mécanismes d'entrée de l'agent pathogène dans l'hôte, il permet cependant d'une part d'assurer l'entrée des *Vibrio* dans l'huître et d'autre part de soumettre chaque individu à un même risque d'infection par injection c'est-à-dire à une même quantité de bactéries pathogènes.

Ce protocole de co-infection expérimentale par injection a donc été appliqué dans le travail présenté dans ce chapitre, protocole réalisé selon une approche focalisée sur l'hôte et qui consistait à tester l'effet de différents facteurs de l'huître sur sa sensibilité à une vibriose expérimentale. La pression pathogénique expérimentale étant reproductible, le contraste analysé s'est porté sur trois facteurs potentiellement corrélés à la variabilité des capacités de résistance de l'huître creuse aux phénomènes de mortalités estivales : la gonadogenèse, le niveau de ploïdie et la composante génétique.

L'influence des deux premiers facteurs, à savoir la gonadogenèse et la ploïdie, sur la sensibilité de l'huître creuse à une vibriose expérimentale, a été explorée au cours d'une étude valorisée dans l'article 3 .

Les aspects portant sur la composante génétique corrélée à cette sensibilité ont fait l'objet d'une seconde étude dont les résultats apparaissent dans la deuxième partie de ce chapitre. Les animaux destinés à ce dernier travail ayant subi à plusieurs reprises au cours de l'étude des événements de mortalités non maîtrisés, la valorisation de ces résultats sous forme de publication est en cours d'évaluation. Cependant, les outils diagnostiques mis au point ont permis de documenter ces épisodes de mortalité et l'analyse de l'ensemble des résultats apparaît sous la forme de résultats annexes (cf. chapitre 2).

3/ On notera à ce niveau qu'une troisième approche d'infection expérimentale par cohabitation a été testée au cours de cette thèse pour des objectifs de pathogenèse : elle est présentée dans le chapitre 3 (cf. article 4).

1 Article 3 : Responses of diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* to *Vibrio* challenge in relation to their reproductive status.

Sophie De Decker, Julien Normand, Denis Saulnier, Fabrice Pernet, Sophie
Castagnet, Pierre Boudry

Submitted in the Journal of Invertebrate Pathology, June 11th 2010

Introduction, objectif et méthodologie

Comme cela a déjà été évoqué dans le chapitre introductif, l'infection bactérienne, considérée dans son évolution, dépend de trois facteurs principaux qui sont 1. la dose ou la quantité de l'agent pathogène qui pénètre dans l'individu, 2. la virulence de l'agent pathogène ou l'intensité de son pouvoir pathogène et 3. la résistance de l'hôte ou sa capacité à lutter contre l'infection. C'est l'exploration de ce dernier facteur, à savoir la résistance de l'huître soumise à une vibriose expérimentale, qui a fait l'objet de l'étude présentée ci-après. Les deux premiers facteurs, la dose et la virulence étant fixés par le biais du protocole d'infection expérimentale reproductible mis au point (Saulnier, *et al.*, 2010), l'objectif était de documenter le phénotype « résistance des huîtres à une vibriose expérimentale » en fonction de deux paramètres susceptibles de moduler cette capacité à lutter contre l'infection, l'effort reproducteur et le niveau de ploïdie. Le statut physiologique de l'huître creuse étant dépendant des conditions environnementales et de caractéristiques génétiques (Samain et McCombie, 2008), le choix des animaux destinés aux expérimentations s'est porté sur des familles de demi-frères issus de croisements contrôlés, réalisés à l'écloserie de l'Ifremer de La Tremblade. Ces animaux apparentés présentaient de plus des groupes de niveaux de ploïdie différents (diploïde $2n$, triploïdes $3n_{CB}$ et $3n_{DT}$) et ont été maintenus dans le même environnement d'élevage tout au long de ce travail.

Ainsi, dans une première approche, une infection expérimentale réalisée par balnéation a été effectuée sur des animaux présentant des stades de gonadogenèse contrastés et a permis de localiser *V. splendidus* LGP32-GFP dans différents tissus de l'huître et de tester son affinité pour le tissu gonadique grâce à un outil d'analyse immunohistologique spécifique. Dans une deuxième approche, la sensibilité à une vibriose expérimentale et le développement gonadique ont été mesurés à quatre reprises tout au long d'un cycle de reproduction sur les huîtres apparentées diploïdes et triploïdes. Les résultats ont été discutés sous l'angle écophysiologique d'allocation énergétique aux différents traits de vie.

Résultats et discussion

1. Mortalités induites pour la première fois par balnéation en présence d'huîtres matures

Jusqu'à présent aucun essai de balnéation expérimentale réalisé sur des huîtres non matures n'avait permis d'induire des mortalités de type vibriose, indiquant la complexité des processus infectieux impliqués dans ce modèle de vibriose expérimentale chez l'huître creuse. Pour la première fois, des mortalités significatives ont été induites par balnéation en présence d'huîtres creuses matures, soulignant l'implication de la gonadogenèse et des événements de ponte dans les infections bactériennes causées par les *Vibrio*, *V. splendidus* et *V. aestuarianus* chez *C. gigas*. De plus, la détection de foyers bactériens à *V. splendidus* LGP32-GFP par immunohistologie dans différents tissus de l'hôte dont le tissu gonadique corrobore cette dernière idée.

Cependant, une telle expérimentation a impliqué un conditionnement artificiel d'une partie des huîtres afin de disposer à un même moment d'individus présentant des stades de reproduction différents : on ne peut exclure un éventuel effet de ce conditionnement sur le statut immuno-physiologique des huîtres testées. De plus, cette méthode ne permet pas de standardiser le processus d'infection au niveau individuel et s'avère donc non reproductible dans l'état actuel des connaissances. Ce résultat ouvre néanmoins des perspectives intéressantes en pathogenèse : grâce à l'outil d'immunohistologie et au caractère non invasif de cette modalité d'infection expérimentale, une cartographie spatio-temporelle d'une infection à *V. splendidus* LGP32-GFP pourrait être établie et ce, chez des huîtres présentant des capacités de résistance contrastées. Les voies d'entrée des *Vibrio* pourraient ainsi être identifiées. Couplé à un test de détection spécifique des métalloprotéases produites par les *Vibrio* étudiés, ce protocole de balnéation expérimentale pourrait également permettre de documenter les mécanismes d'infection mis en jeu.

Enfin, l'entrée des pathogènes dans l'hôte observée par cette méthode d'infection expérimentale non invasive nous a poussé à mettre au point un autre protocole non invasif par cohabitation d'huîtres infectées par injection avec des huîtres non infectées. Ce protocole, plus simple à mettre en œuvre que la balnéation sur des animaux en gamétogenèse, a été appliqué dans des objectifs de description de la pathogenèse à *V. splendidus* et *V. aestuarianus* chez l'huître creuse. Le troisième chapitre est consacré à ce travail valorisé sous forme d'article (cf. chapitre 3, article 4).

2. La maturité sexuelle augmente la sensibilité des huîtres diploïdes et triploïdes à une vibriose expérimentale

L'analyse des cinétiques de survies obtenues en mai, juin, août 2007 et janvier 2008 révèle des capacités de résistance à la vibriose expérimentale variables au cours du cycle de reproduction étudié. Le résultat le plus marquant reste l'amélioration des survies observées fin août chez les trois groupes étudiés, 2n, 3nCB et 3nDT, comparées aux survies obtenues début mai et fin juin. Si l'on considère le compromis (ou « trade-off ») observé entre la reproduction et la survie chez l'huître creuse (Beattie, *et al.*, 1980; Perdue, *et al.*, 1981; Ernande, *et al.*, 2004; Boudry, *et al.*, 2008), il est pertinent de corréliser cet effet « date » aux stades de gonadogenèse évalués et d'interpréter ainsi cette variation de sensibilité comme un effet de la maturation sexuelle sur les performances de survies. L'intensité de l'effort de reproduction mesurée individuellement à chaque infection expérimentale apparaît optimale fin juin pour les trois groupes de ploïdie considérés. L'importance de l'effort de reproduction communément observé chez l'huître creuse diploïde (Deslous-Paoli et Héral, 1988; Van der Meer, 2006; Enríquez-Díaz, *et al.*, 2009) pourrait fragiliser ses capacités de réponse à une vibriose expérimentale, hypothèse déjà évoquée pour expliquer les conditions d'apparitions des mortalités estivales (Soletchnik, *et al.*, 1997; Delaporte, *et al.*, 2006; Pouvreau et Lepennec, 2006; Duchemin, *et al.*, 2007; Li, *et al.*, 2009a). De plus, il a été montré une diminution des capacités de phagocytose et d'adhésion des hémocytes chez l'huître en période de reproduction (Delaporte, *et al.*, 2006; Gagnaire, *et al.*, 2006b; Li, *et al.*, 2009b). Par ailleurs, la sensibilité accrue des huîtres en période de gamétogenèse active pourrait également s'expliquer par un phénomène d'ordre mécanique : en effet, Tran *et al.* (2008) ont suggéré que le flux d'hémolymphe était perturbé du fait de l'augmentation de taille de la gonade et du développement important des cellules germinales au sein des follicules.

3. La réduction du développement gonadique des huîtres triploïdes n'induit pas une amélioration de leur résistance à une vibriose expérimentale

Alors que des études précédentes réalisées *in situ* ne permettent pas de conclure fermement sur une meilleure capacité de résistance des triploïdes aux mortalités estivales (Allen et Downing, 1986; Cheney, *et al.*, 2000; Garnier-Géré, *et al.*, 2002; Gagnaire, *et al.*, 2006b), la sensibilité des huîtres triploïdes considérée sur l'ensemble des infections expérimentales apparaît sensiblement identique à celle des diploïdes. De plus, l'amélioration des survies observées chez les triploïdes à la fin de l'été comparée à celles observées en mai et en juin suggère fortement une altération des capacités de résistance de ces huîtres en période de reproduction ; les mesures d'occupation gonadique réalisées indiquent une allocation significative à la reproduction chez ces individus triploïdes, comme cela a

déjà été rapporté (Allen et Downing, 1990; Normand, *et al.*, 2009). Si les occupations gonadiques moyennes des triploïdes apparaissent cependant 2 à 3 fois inférieures à celles mesurées chez les diploïdes sans pour autant induire une amélioration des survies, les triploïdes présentent un cycle de reproduction perturbé associé à de nombreux phénomènes d'atrésie (Allen et Downing, 1990; Shpigel, *et al.*, 1992; Normand, *et al.*, 2008). Ces phénomènes de destruction tissulaire représentent probablement des conditions favorables au développement bactérien de la flore résidant dans l'huître. La sensibilité des triploïdes à une vibriose expérimentale suggère donc l'existence d'une sous-estimation du coût de la reproduction telle que mesurée dans ce travail et de coûts probables additionnels associés à la perturbation de leur cycle de reproduction, et notamment aux phénomènes d'atrésie.

4. La dépression hivernale des triploïdes

Alors que les survies des individus diploïdes s'améliorent progressivement en automne puis en hiver, les huîtres triploïdes quant à elles, apparaissent plus sensibles à une vibriose expérimentale en hiver. Ce résultat suggère une fragilité intrinsèque des huîtres triploïdes alors que les survies des diploïdes ne sont plus affectées par la fonction de reproduction. Cette fragilité intrinsèque reliée à une fonction autre que la reproduction, pourrait être le résultat d'une fonction de maintenance agissant en puits énergétique, impliquant une demande en ressource énergétique plus importante chez les triploïdes, pour assurer leur survie. Des observations de pertes de poids régulièrement rapportées en automne chez les triploïdes pourraient également être expliquées par cette hypothèse (Allen et Downing, 1986; Lambert, *et al.*, 2008). De plus, chez d'autres espèces, il a été montré des performances de survies hors période de reproduction chez des individus triploïdes inférieures à celles observées chez leurs homologues diploïdes (Chourrout, *et al.*, 1986; Quillet, *et al.*, 1988; O'Flynn, *et al.*, 1997; Ching, *et al.*, 2009; Piferrer, *et al.*, 2009). Ces résultats remettent en question chez les huîtres, l'hypothèse conférant un avantage net des triploïdes pour leur capacité de survie, relié à une augmentation de l'hétérozygotie et comparé aux diploïdes (Hawkins, *et al.*, 2000; Ginn, in press).

Title

Responses of diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* to *Vibrio* challenge in relation to their reproductive status.

Submitted in the Journal of Experimental Biology, June 11th 2010

Authors

Sophie De Decker¹, Julien Normand¹, Denis Saulnier¹, Fabrice Pernet², Sophie Castagnet¹, Pierre Boudry^{3*}

¹ Ifremer, Laboratoire de Génétique et Pathologie, La Tremblade, France

² Ifremer, Laboratoire Environnement Ressources Languedoc-Roussillon, Sète, France

³ Ifremer, Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, Plouzané, France

* Corresponding author: Pierre Boudry@ifremer.fr

Abstract

Several *Vibrio* species are known to be pathogenic to the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Survival varies according to pathogen exposure, but also genetics and reproductive status; high mortality events usually occurring during gametogenesis. In order to study the effects of gametogenetic status and ploidy (a factor known to affect reproduction allocation in oysters) on vibriosis survival, we conducted two successive experiments. Our results demonstrate that a common bath challenge with pathogenic *Vibrio splendidus* and *V. aestuarianus* on a mixture of mature, spawning and non-mature oysters can lead to significant mortality. Previous bath challenges, which were done using only non-mature oysters, had not produced mortality. Immunohistochemical analyses showed the affinity of *Vibrio* for gonadic tissues, highlighting the importance of sexual maturity for vibriosis infection processes in oysters. Mortality rate results showed poor repeatability between tanks, however, in this bath challenge. We then tested a standardized and repeatable injection protocol using two different doses of the same combination of two *Vibrio* species on related diploid and triploid oysters at four different times over a year. Statistical analyses of mortality kinetics over a 6-day period after injection revealed that active gametogenesis periods correspond to higher susceptibility to vibriosis and that there is a significant interaction of this seasonal effect with ploidy. However, no significant advantage of triploidy was observed. Triploid oysters even showed lower survival than diploid counterparts in winter. Results are discussed in relation to cost of reproduction and differing energy allocation patterns between diploid and triploid Pacific oysters

Keywords

Experimental vibriosis, *Crassostrea gigas*, *Vibrio splendidus*, *Vibrio aestuarianus*, survival distribution function, triploidy, reproductive effort, GFP mutant

Running title

Diploid and triploid oyster vibriosis

1. Introduction

For many years, significant mortalities of Pacific oyster *Crassostrea gigas* have been reported during the summer period. These seasonal mortalities produce no specific clinical signs of disease and affect both juveniles and adults, but are usually greater among young individuals (i.e. “seed” or “juv”). This is notably the case in France, where seed mortalities have become a serious threat to the oyster industry. The aetiology of this phenomenon is clearly multifactorial, resulting from complex interactions between pathogenic agents, environmental factors and the genetic and physiological status of the oysters (Samain and McCombie, 2008).

Two main types of pathogenic agents, the herpes virus OsHV-1 (Renault et al., 1995) and bacteria of the genus *Vibrio* (*Vibrio splendidus* and *Vibrio aestuarianus*), have been detected in dying oysters during summer mortality episodes (Garnier et al., 2007; Gay et al., 2004; Labreuche et al., 2006b; Lacoste et al., 2001; Le Roux et al., 2002; Saulnier et al., 2009). For *Vibrio*, a four-year epidemiological survey (2003-2007) aiming to identify bacteria pathogenic to *C. gigas* confirmed the high incidence of *Vibrio splendidus* and *Vibrio aestuarianus* bacterial strains associated with mortality events in France (Saulnier et al., 2010). The virulence of the *Vibrio* strains isolated during mortality outbreaks has also been assessed using a controlled experimental infection approach (Saulnier et al., 2010). Experimental challenges using virulent *Vibrio* are facilitated by the cultivability of these bacteria in synthetic media. Such techniques allow bacterial strains to be purified, but are not available for other major infective pathogens of *C. gigas* such as herpes virus OsHV-1.

Besides virulence of pathogenic agents, the variability of oyster physiological status, which is under the control of environmental conditions and genetic characteristics, probably explains much of the variability observed in severity of summer mortality episodes (Samain and McCombie, 2008). Indeed, allocation to each of the main physiological functions (i.e. growth, reproduction and survival) is known to covary, generating physiological and/or genetic trade-offs (Kooijman, 2000; Stearns, 1976). Thus, high reproductive effort for *C. gigas*, which can account for 55 % of the annual energy budget (Van der Meer, 2006), was expected to result in an increase in mortality. A reproduction-survival trade-off was demonstrated using selective breeding experiments (Beattie et al., 1980; Boudry et al., 2008; Perdue et al., 1981). The proposed explanation was that high sexual maturation activity could lead to physiological weakness (Mori, 1979), and that this would result in an immune depression (Duchemin et al., 2007; Li et al., 2009b; Pouvreau and Lepennec, 2006; Soletchnik et al., 1997). Moreover, some environmental factors are known to trigger gonadic tissue development. High food availability (Chavez-Villalba et al., 2003) and warmer seawater temperature (Fabioux et al., 2005) have been shown to increase reproductive allocation. Due to the trade-off between reproductive effort

and survival mentioned above, these factors have also been shown to be associated with higher summer mortality (Pouvreau et al., 2003; Soletchnik et al., 2005; Soletchnik et al., 1999; Soletchnik et al., 2007). Finally, the sign of the genetic correlations between summer survival and reproductive allocation have also been shown to vary according to food abundance (Ernande et al., 2004), demonstrating the primary importance of exogenous factors in controlling energy allocation to different physiological functions and their covariation.

In oysters, triploidy induction is the most common genetic method to enhance production yield through phenotypic improvement (Piferrer et al., 2009). Triploidy affects allocation to physiological functions in oysters and a wide-range of other species. Most importantly, triploid Pacific oysters commonly exhibit a reduced but variable reproductive effort (Normand et al., 2009) and, in parallel, exhibit faster growth than diploid individuals (Allen and Downing, 1986; Nell and Perkins, 2005). Triploid oysters have also been seen to have higher resistance to summer mortality (Boudry et al., 2008), although contradictory performances have also been reported for triploid summer survival (Cheney et al., 2000). It should, however, be noted that only a limited number of studies have examined physiological performances of triploid molluscs, meaning that little is known about actual energetic allocation to different functions. The improved growth and survival of triploid oysters has mainly been interpreted as an indirect effect of triploidy through energetic reallocation from gonadic development to somatic growth and resistance (Allen and Downing, 1986; Allen and Downing, 1990; Garnier-Géré et al., 2002). An alternative hypothesis explains the improvement of survival in triploid oysters as a result of a superior energy budget irrespective of energetic re-allocation processes (Hawkins *et al.*, 1994)

The present study aimed to investigate the relationships between ploidy, survival and reproductive allocation, in oysters challenged with pathogenic *Vibrio*. First, a non-invasive experimental infection protocol coupled with specific immunohistochemical analysis was used to localize pathogenic *Vibrio* in oyster organs and to test for its affinity for gonadic tissue. Second, susceptibility to vibriosis and gonad development were studied over an annual reproductive cycle on related diploid and triploid oysters using a reproducible experimental co-infection protocol and two pathogenic *Vibrio* (*V. splendidus* and *V. aestuarianus*) (Saulnier *et al.*, 2010). Outcomes are discussed in terms of resource allocation and life-history theory. The results offer some insight into the oyster summer mortality phenomenon and, more generally, show how host-bacteria interactions can mitigate infectious diseases in bivalves.

2. Material and methods

2.1. First experiment – Bath challenge and immunohistochemical analysis

2.1.1. Animals studied and reproductive conditioning

One-year-old diploid *C. gigas* oysters from natural recruitment in the Bassin de Marennes-Oléron (Charente-Maritime, France) were purchased and matured for two months indoors, using controlled temperature (20 °C) and food availability (Ifremer, La Tremblade) to induce contrasted reproductive status in different sets of oysters at the same point in time. Three types of oysters were thus prepared from a common initial population: 1. spawning, 2. mature, 3. non mature animals. All oysters were maintained at 16 °C for two days before the bath challenge (described below) in order to induce spawning events in the ripe individuals when they were transferred to the experimental tanks at 20 °C.

2.1.2. Bath challenge

A bath infection challenge with *V. splendidus* LGP32-GFP and *V. aestuarianus* 02/041 strains was first carried out on diploid oysters displaying contrasted sexual maturity. Groups of 3 to 5 oysters of each type (1. spawning, 2. mature, 3. non mature animals) were placed together in 10-litre tanks, after shell tagging for identification. Four tanks were set up for the bath challenge and three other tanks were prepared in the same way as an infection control. The combination of LGP32-GFP and 02/041 strains was produced by mixing suspensions of each bacterium at equal concentration (1:1 v/v), as described in Saulnier *et al.* (2010), and adding the mixture to the UV-treated seawater of each tank at a concentration of 10^6 CFU/ml (CFU: Colony Forming Unit) established by absorbance determination at 600 nm wavelength and by plate counting method on Marine Agar (Difco) using appropriate dilutions. Oysters were immersed in contaminated seawater at 18 °C for 40 h in non-circulating aerated conditions. They were then abundantly rinsed with UV-treated seawater and transferred to new tanks filled with fresh UV-treated seawater. Control oysters were treated in the same manner as bath-infected ones, replacing the *Vibrio* inoculum with artificial seawater. Spawning events were induced by thermal stress at 20°C in all tanks; they were observed in both contaminated and control tanks 1-2 h post-transfer, with strong contractions of the oyster muscle and gametes visible in the water. Thereafter, oyster mortality was monitored daily for 2 weeks. Any dead oysters were removed from each tank daily, individually labelled and fixed in Davidson's fluid (30 % filtered seawater, 30 %

ethanol 95 %, 20 % formol 36 %, 10 % glycerol and 10 % acetic acid) for immunohistochemical analysis.

2.1.3. Immunohistochemical analysis

Because the LGP32-GFP mutated strain also has a gene coding chloramphenicol acetyl transferase (CAT), responsible for resistance to chloramphenicol, this last gene product was targeted to immunolocalize LGP32-GFP by immunohistochemistry. This mutant *V. splendidus* strain was provided by F. Le Roux. A commercial polyclonal sheep antibody against CAT type 1 and labelled with digoxigenin antigen was purchased from Roche. Before use, the specificity of the polyclonal antibody solution was increased by *in vitro* absorption on a wild LGP32 strain bacterial suspension.

A few dead mature animals sampled during bath immersion were fixed in Davidson's fluid for 24 h and transferred to 70 % ethanol before being dehydrated in alcohol-xylene series and embedded in paraffin wax. All steps were performed at room temperature. Sections of 5 μm were mounted on silane-pretreated slides (Sigma), dewaxed, rehydrated, and successively incubated for 30 min in blocking reagent (Roche) prepared in 1X Tris-buffered saline solution (TBS), 30 min with anti-CAT antibody (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) prepared in blocking reagent TBS solution, and 30 min with anti-Digoxigenin Fab fragments antibody conjugated with alkaline phosphatase (Roche) and diluted in TBS. Slides were washed twice with TBS between each step. Immuno-detection was performed with alkaline phosphatase chromogen BCIP-NBT (Sigma) prepared in an alkaline phosphatase buffer (Tris-base 100 mM pH 9, MgCl_2 50 mM, NaCl 100 mM) during one hour of incubation. Slides were then counter-stained with Bismarck brown, mounted and observed under white light microscopy.

2.1.4. Statistical analysis

A χ^2 test was performed to analyse significant differences of survival rates obtained after the bath challenge comparing with those obtained after the control bath.

2.2. Second experiment – Injection challenges

2.2.1. Animals studied

The origin of the oysters used in this part of the study and the rearing procedures used are described in detail by Normand *et al.* (2009). Briefly, diploid ($2n$) and triploid ($3n_{\text{CB}}$ and $3n_{\text{DT}}$) groups

were produced in June 2006 by crosses between diploid genitors or between diploid and tetraploid genitors. The 3nCB oysters were obtained by chemically-induced retention of polar body II (Gérard et al., 1999) on diploid × diploid crosses, while 3nDT oysters were obtained by crossing diploid females with tetraploid males (Guo et al., 1996). One diploid female, 16 diploid males and 16 tetraploid males were used to generate the corresponding progenies. This scheme of crosses allowed genetic differences between triploids and diploids to be minimized by using common genitors for the three groups as far as possible. Ploidy of these progenies was assessed by flow cytometry on two samples of 100 individuals per group, using DAPI staining of whole DNA content of the nucleus (Allen, 1983). Triploidy was thus confirmed to be over 95 % successful for both 3nCB and 3nDT groups.

All half-sib families were grown in the same zootechnical facilities and rearing site in order to homogenize the environmental conditions among groups. Oyster rearing was conducted following standard hatchery and nursery procedures, after which oysters were transferred to plastic mesh bags, attached to off-bottom iron tables following the local farming practices in the Bassin de Marennes Oléron (Charente-Maritime, France). All three groups were monitored monthly throughout the rearing and experimental period. No significant mortality was ever observed in the oyster bags in the intertidal area during the period of challenge studies in the laboratory with animals of the same groups.

2.2.2. Experimental design of the injection challenges

Three preliminary injection experiments were performed on sampled oysters from the three groups during April 2007 in order to determine appropriate injection doses for a DL50.

Four successive experimental challenges were performed starting on May 10th 2007 (date A), June 26th 2007 (date B), August 29th 2007 (date C) and January 21st 2008 (date D), corresponding to different reproductive stages in the diploid oysters (Table 1). For each challenge, 42 to 69 (mean number = 57) randomly sampled oysters from each group were placed in thermo-controlled aerated seawater in order to acclimate them to the seawater temperature at 20 °C over five days before transfer to the infection room. Subsequently, 100 µL of a mix of virulent *Vibrio* suspension were injected into the adductor muscle of the oysters. The challenge procedures are described in Saulnier *et al.* (2010). In the present study, the two different virulent *Vibrio* strains belonging to both species frequently detected during oyster mortality outbreaks - *Vibrio splendidus* LGP32-GFP strain and *Vibrio aestuarianus* 02/041 strain (Garnier et al., 2007) - were used in equal concentration because of their synergistic effect (Saulnier *et al.*, 2010). At each date, the pre-determined high dose and low dose were used, corresponding respectively to 10⁷ and 10⁶ total CFU injected per individual, as defined in the three preliminary injection experiments (see above). Negative controls consisted of a group of 20 to 36 oysters injected with sterile artificial seawater. At least three tanks were used per date, group and dose as experimental structure replicates (16 to 21 oysters per tank). Mortality was monitored twice a day and newly dead oysters were removed from each tank over a 6-day period. Moribund animals were

checked for infection by LGP32-GFP and 02/041 pathogenic strains using classical bacteriological analysis on haemolymph samples, and specific molecular-based-diagnostic tests (Saulnier et al., 2007).

Table 1: Characteristics of experimental infection challenges (infection date, injected dose, number of animals transferred to the infection room). CFU: Colony Forming Unit, SASW: Sterile Artificial Sea Water.

Infection	Injected dose (CFU/ind.)	Number of animals injected		
		2n	3nDT	3nCB
A 10-May-07	10 ⁷	63	53	
	10 ⁶	62	54	not tested
	SASW	26	32	
B 26-Jun-07	10 ⁷	48	49	48
	10 ⁶	48	49	49
	SASW	20	20	20
C 29-Aug-07	10 ⁷	60	60	56
	10 ⁶	61	63	59
	SASW	20	20	20
D 21-Jan-08	10 ⁷	69	68	42
	10 ⁶	67	68	49
	SASW	36	36	21

2.2.3. Histological characterization

Qualitative (reproductive stage, see Table 2) and quantitative (gonadic occupation, GO) monitoring of oyster reproductive effort was performed on subsamples of the experimental groups. A mean of 40 individual oysters were analysed per date and group. Histological slides of *C. gigas* tissues were analysed following the method described in Normand *et al.* (2009) to obtain the area fractions of gonadic tissue (GA) and the whole visceral mass area (WVMA). Reproductive effort was estimated by gonadic occupation (GO) as: $GO (\%) = GA \times 100 / WVMA$. Reproductive stage of diploid oysters was determined following a qualitative classification (5 stages from 0 to 4) adapted from Mann (1979) and Lango-Reynoso (2000). The reproductive stages of triploid oysters are not presented here due to the lack of an appropriate classification scale (Normand et al., 2009).

Table 2: Reproductive scale for *Crassostrea gigas* based on Mann (1979) and Lango-Reynoso *et al.* (2000).

Stage	Histological description
0 (resting stage)	No trace of sexual development; follicles are non-existent or elongated and consist of undifferentiated germinal epithelium
1 (early growth stage)	Follicles are small and isolated with numerous spermatogonia or oogonia
2 (late growth stage)	Follicles are actively developing with primary gametocytes and some free (secondary) spermatozoa and oocytes
3 (mature)	Near ripe or ripe follicles, densely packed with maturing gametes; presence of mature gametes
4 (spawning and reabsorption stages)	Follicles distended, numerous gametes remain

2.2.4. Statistical analysis

All statistical analyses were done with SAS (Statistical Analysis Software, V.9).

For each of the *Vibrio* injected oysters (n=1245), we modelled the time from injection to death. We eliminated those animals that had not died by the last assessment, 6 days post-injection time from this analysis.

Considering the entire data set, we were first interested in modelling the effects of the categorical predictors and their interactions on the survival functions. We built a general model including the following variables: experimental infection date (dates: A, B, C et D), experimental group (groups: 2n, 3nDT, 3nCB), treatment (injection doses: higher or lower) and experimental structure replicate (at least 3 replicates by date, group and dose). We used Cox proportional hazard model to perform regression analysis of survival data, employing the TPHREG procedure (Proportional Hazard Regression) that specifically allowed us to quantitatively examine the relationship between the survival kinetics of oysters, categorical variables and their interactions. We also used a contrast statement in order to test for effects of ploidy level (i.e. diploid versus triploid) and triploidy induction method (i.e. 3nCB versus 3nDT). The complete model first included all fixed effects and interaction

terms between date, group, treatment and replicate. We then performed classical backward elimination procedure to obtain the final reduced model: $\text{Survival} = \text{date} + \text{group} + \text{treatment} + \text{date} \times \text{group} + \text{date} \times \text{treatment}$.

This analysis detected highly significant interactions between infection date, group, and treatment. We therefore performed univariate analysis using the non-parametric Kaplan-Meier method to test for differential performances among groups at the same date or within groups throughout the sampling period (Kaplan and Meier, 1958). We used the LIFETEST procedure to compute non-parametric estimates of the survival distribution function and generate mean survival time estimators. Equivalences between the survival curves within groups and among groups using the same infection dose were tested with Wilcoxon tests.

For the investigation of group and date effects on gonadic occupation, we verified the homogeneity of variances using a Levene test (UNIVARIATE procedure) and values were squared-transformed to ensure homoscedasticity. An analysis of variance model (GLM procedure) (Littel et al., 2002) was finally built as: $\text{GOt} = \text{date} + \text{group} + \text{date} \times \text{group}$.

Due to a significant interaction between date and group, we tested for date effect within group using a LS-means statement. We decided to exclude the values for gonadic occupation measured at date D, because gonadic occupation was null in all sampled individuals at this time.

3. Results

3.1. Bath challenge and immunohistochemical analysis.

3.1.1. Mortality rates

Mean survival at 13 days post-infection after 40 h bath challenge is presented in Fig. 1A. No significant mortality had occurred in control tanks and survival was very significantly lower in bath challenged tanks than in control tanks ($\chi^2 = 27.62$, $p < .0001$). To our knowledge, this is the first time that experimental vibriosis infection using a bath protocol efficiently induced any mortality in *C. gigas*. A high variability of survival rates was found for bath challenge conditions, with one tank showing quite low mortality. Survival rates measured in the four tanks were 15 %, 29 %, 36 % and 78 %. Furthermore, we found no significant differences in mortality with reproductive status ($\chi^2 = 1.18$, $p = 0.5551$; survival rates of 31%, 42 % and 45 % for spawning, mature and non mature individuals, respectively).

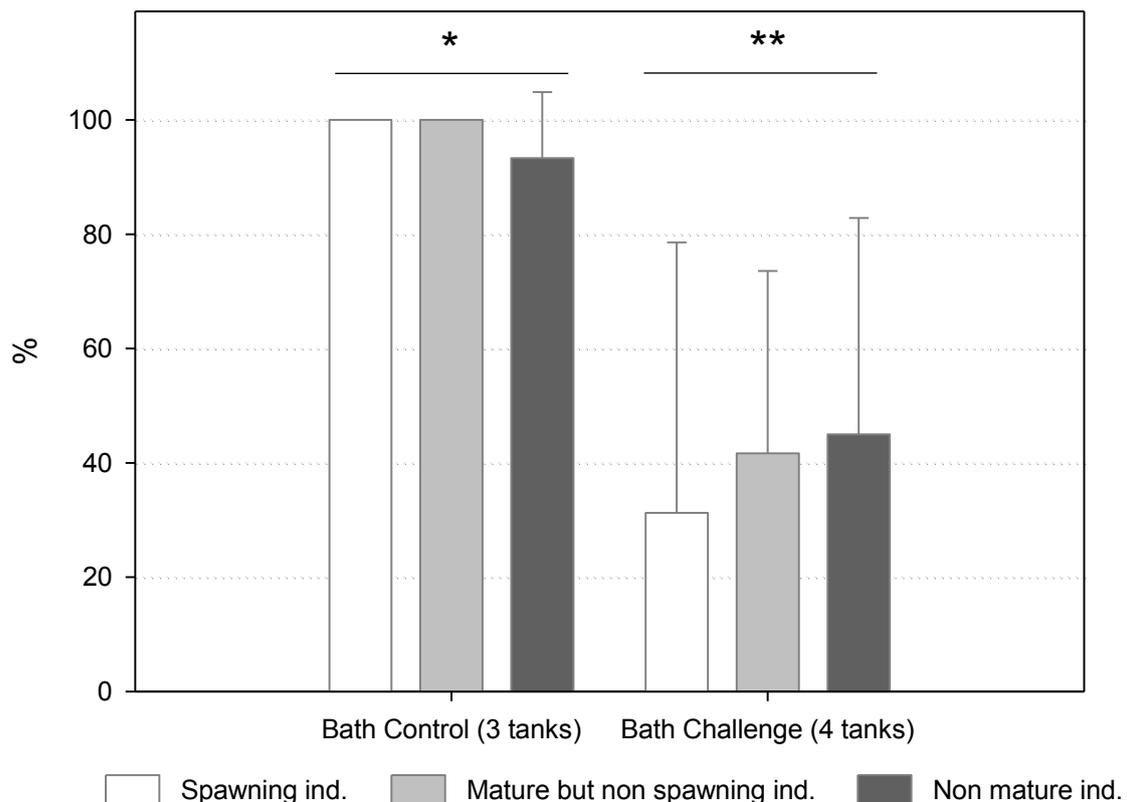


Fig. 1 A: Mean (\pm SE) survival rates (%) obtained 13 days post-infection after 40 h exposure to *V. splendidus* LGP32-GFP and *V. aestuarianus* 02/041 strains by bath immersion. Results are given according to the reproductive status of the tested oysters. A χ^2 test was performed to analyse significant differences of survival rates obtained after bath challenge.

3.1.2. *V. splendidus* LGP32-GFP strain localization in gonadic tissues

Immunohistochemical analysis revealed that the mutant *V. splendidus* LGP32-GFP strain had infected different kinds of tissues in several oysters that died 7 days post-infection after 40 h of contact with this strain by bath challenge (Fig. 1B). In contrast, no labelling was observed in control animals, confirming the specificity of the diagnostic test. Numerous bacteria were detected for the first time in the gonadic tissue, but also in the adductor muscle, conjunctive tissue or digestive gland, with bacterial cells found alone or organized in foci (Fig. 1B, pictures 1, 2, 3, 4, 6, 7 and 8).

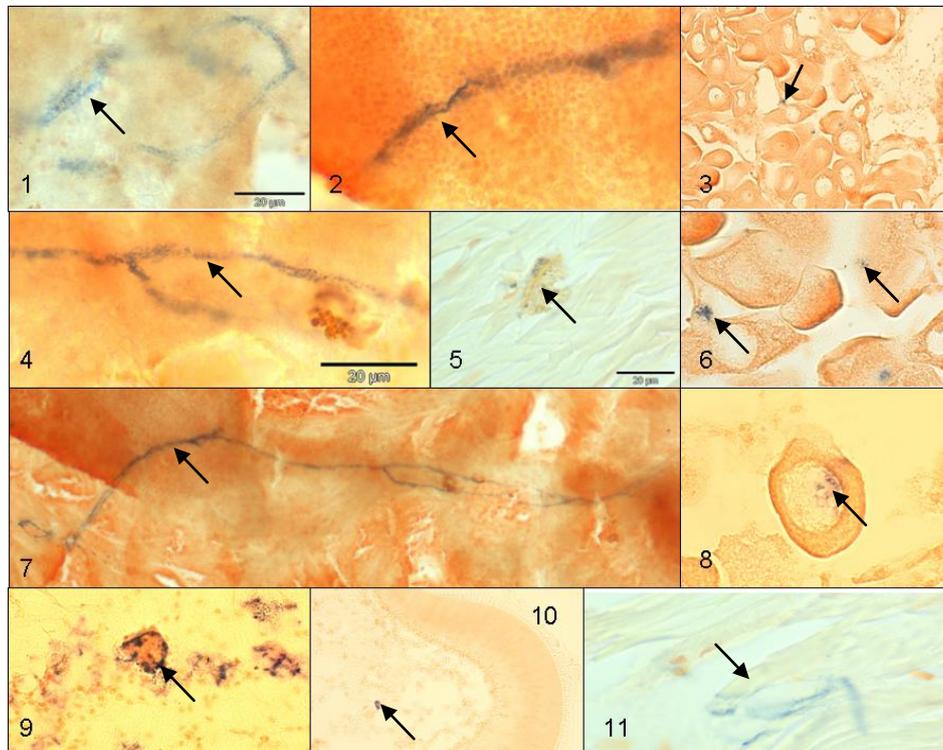


Fig. 1 B: *V. splendidus* LGP32-GFP mutated strain infecting *Crassostrea gigas*. Immunohistochemical analysis of (1,2,3,4,6,7,8) gonadic tissue, (5,11) adductor muscle and (9,10) conjunctive tissue of oysters that had died during the 7 days following the 40h exposure to *V. splendidus* LGP32 and *V. aestuarianus* 02/041 strains by bath immersion.

3.2. The four injection challenges

3.2.1. Reproductive status of oysters during the four injection experiments

Histological analysis allowed us to determine the sexual maturation stages and gonadic occupation at the time of each experimental infection (Table 2) and to compare reproductive status of diploid and triploid oysters.

At the time of the first infection (A), the majority of individuals in the diploid group had initiated their reproductive maturation and presented early stages of gonadic development, with 7 % of individuals in stage 1 and 90 % in stage 2 (Fig. 2A); mean gonadic occupation was 34 %. Most triploid oysters (about 90 %) also presented immature gonadic tissues, with a lower - but significant - GO (16 %) compared with diploid individuals (Fig. 2B).

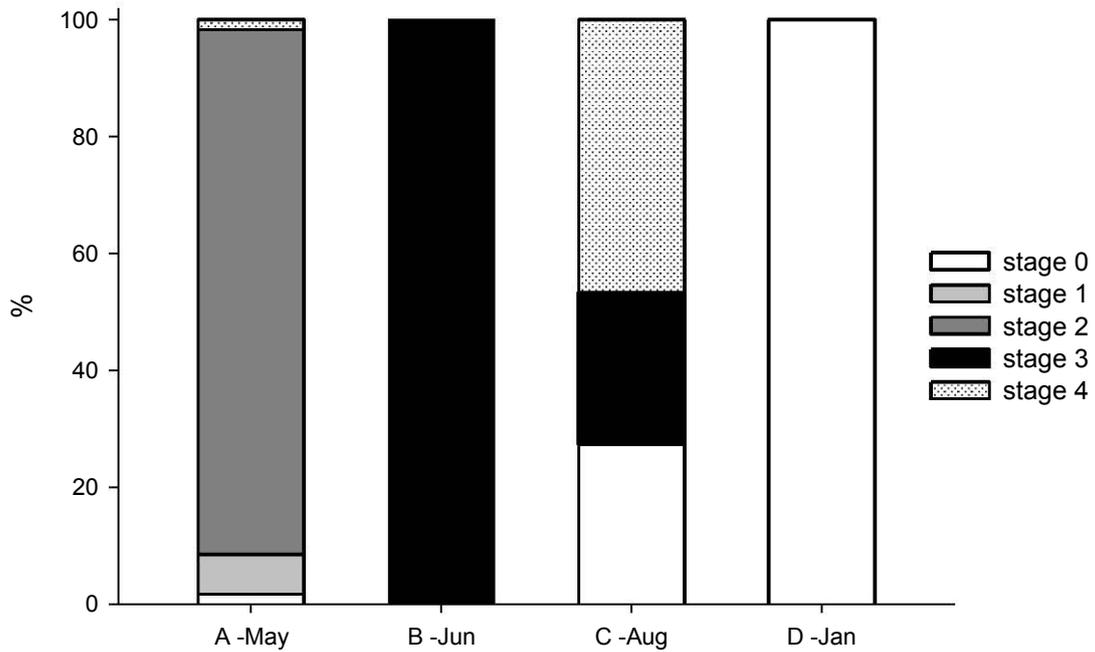
At the time of the second infection (B), all diploid oysters were ripe, i.e. in stage 3, reaching complete maturation of their gonadic tissues and ready to spawn (Fig. 2A). Their mean GO was significantly higher than at the time of infection A (68 %) ($p < 0.0001$). Triploid oysters presented a similar gonadic occupation as at infection A ($p = 0.1302$) (Fig. 2B).

At the third infection (C), about 25 % of diploid oysters were still in stage 3 while a larger proportion (about 50 %) were in the post-spawning stage (stage 4) (Fig. 2A). Moreover, the remaining quarter showed no development of gonadic tissues at all (stage 0), suggesting that they had spawned a few weeks before sampling (Fig. 2A). As a result, the mean GO of diploid oysters was lower than at the time of infection B (49 %) ($p < 0.0001$). A few triploid individuals still showed some gonadic maturation at date C with low mean GO (for 3nDT group, $p < 0.0001$ and for 3nCB group, $p = 0.0034$), indicating that most oysters of the triploid groups underwent resorption of gonadic tissues.

Finally, as expected for the winter period, no sexual activity was observed at the time of infection D (100 % of individuals being in stage 0) (Fig. 2A).

Overall, clear reproductive differences were visible between diploid and triploid oysters at infections A, B and C, while no difference was observed during the resting stage when infection D was performed. The two types of triploid (3nCB and 3nDT) showed similar reproductive status over the sampling dates, except at infection C where GO was higher for 3nDT than for 3nCB (3 % versus 11% respectively).

A.



B.

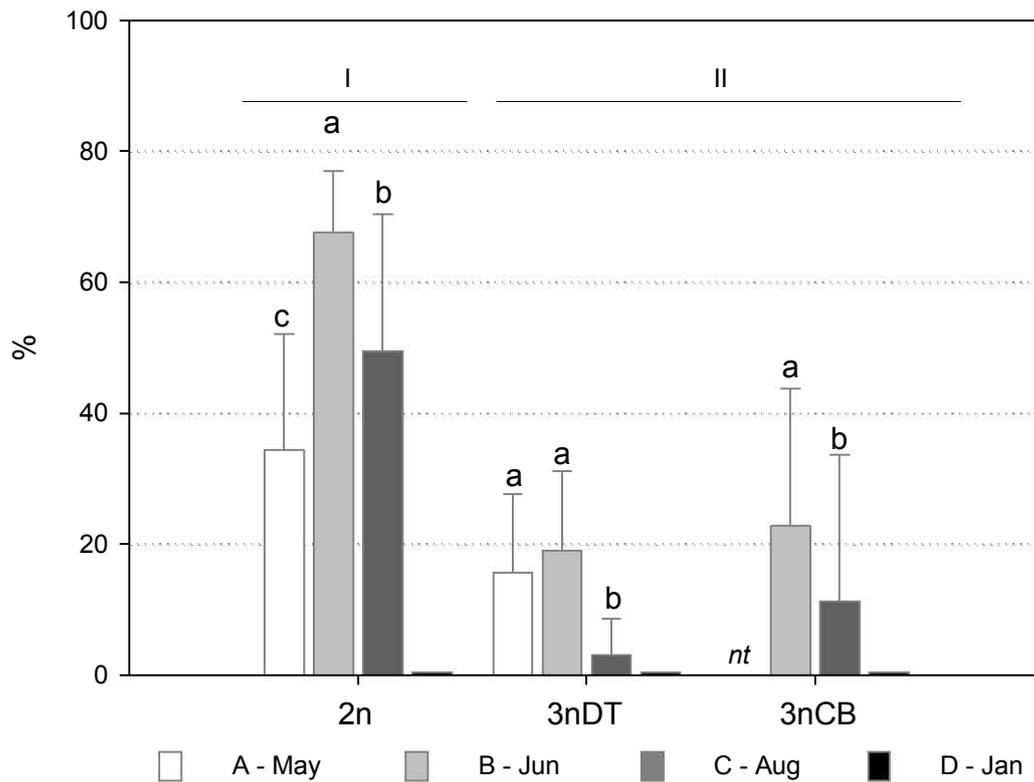


Fig. 2 **A.** Variation in proportion of sexual maturity stages for diploid individuals tested at the four *Vibrio* injection challenges (A, B, C, D) using the reproductive scale for *Crassostrea gigas* based on Mann (1979) and Lango-Reynoso *et al.* (2000) (see Table 1). **B.** Mean gonadic occupation (GO %) measurements (\pm SE) made on 2n, 3nDT and 3nCB individuals tested at the four *Vibrio* injection challenges (A, B, C, D). Different letters indicate significant differences among and within groups (ANOVA, $p < 0.001$). "nt" means "not tested".

3.2.2. Injection dose characterization

Two infection doses flanking the LD50 were determined in three preliminary experiments and used for the four injection experiments. The lower dose, corresponding to the injection of a mix of LGP32 and 02/041 strains at 5×10^5 CFU oyster⁻¹ for each strain, gave a mean survival rate of 76 ± 15 %, whereas the higher dose, corresponding to the injection of a mix of LGP32 and 02/041 strains at a dose of 5×10^6 CFU oyster⁻¹ for each strain, gave a mean survival rate of 35 ± 20 %. This dose determination allowed us to control the degree of severity of the challenge and to obtain analyzable variable survival rates.

3.2.3. Experimental infection monitoring

No mortality occurred in the control tanks in any of the experiments (data not shown). Mortality in the inoculated treatments was therefore considered to be due to the *Vibrio* mix. Moreover, molecular and classical bacteriological diagnostic tests confirmed the *Vibrio* infection with a high concentration, up to 10^6 CFU/ml, of the inoculated *Vibrio* found in individual haemolymph samples.

3.2.4. Survival of the injection challenge

3.2.4.1. The Proportional Hazard model with categorical covariates: multivariate approach

The contrast analysis done using the TPHREG procedure detected a significant differentiation between diploid and triploid groups ($\chi^2 = 6.12$, $p = 0.013$) but did not detect any effect of triploidy induction method ($\chi^2 = 0.22$, $p = 0.640$) (Table 3).

Global analysis revealed a very significant treatment effect ($\chi^2_1 = 50.77$, $p < .0001$), which is due to the lower survival obtained with the higher injection dose. Date and group effects were also significant (respectively $\chi^2_3 = 10.24$, $p = 0.017$; $\chi^2_2 = 6.17$, $p = 0.046$), as was their interaction ($\chi^2_5 = 11.44$, $p = 0.043$) and the interaction between date and treatment ($\chi^2_3 = 8.68$, $p = 0.034$). Consequently, we analysed survival functions with a univariate approach in order to further describe the variability of response to experimental vibriosis.

Table 3: Cox regression model results using the TPHREG procedure.

Variables	DDL	χ^2	Pr > χ^2
Date	3	10.24	0.017
Group	2	6.17	0.046
Treatment	1	50.77	< .0001
Date \times Group	5	11.44	0.043
Date \times Treatment	3	8.68	0.034
<i>Results of the contrast statement</i>			
2n vs 3n	1	6.12	0.013
3nCB vs 3nDT	1	0.22	0.640

3.2.4.2. Kaplan-Meier estimates of survival functions: univariate approach

For each treatment, the survival distribution function, which represents the proportion of animals still alive each day of the period following injection, was characterized by the product-limit method (Kaplan and Meier, 1958), and plotted from the day of injection until the end of the test (Fig. 3).

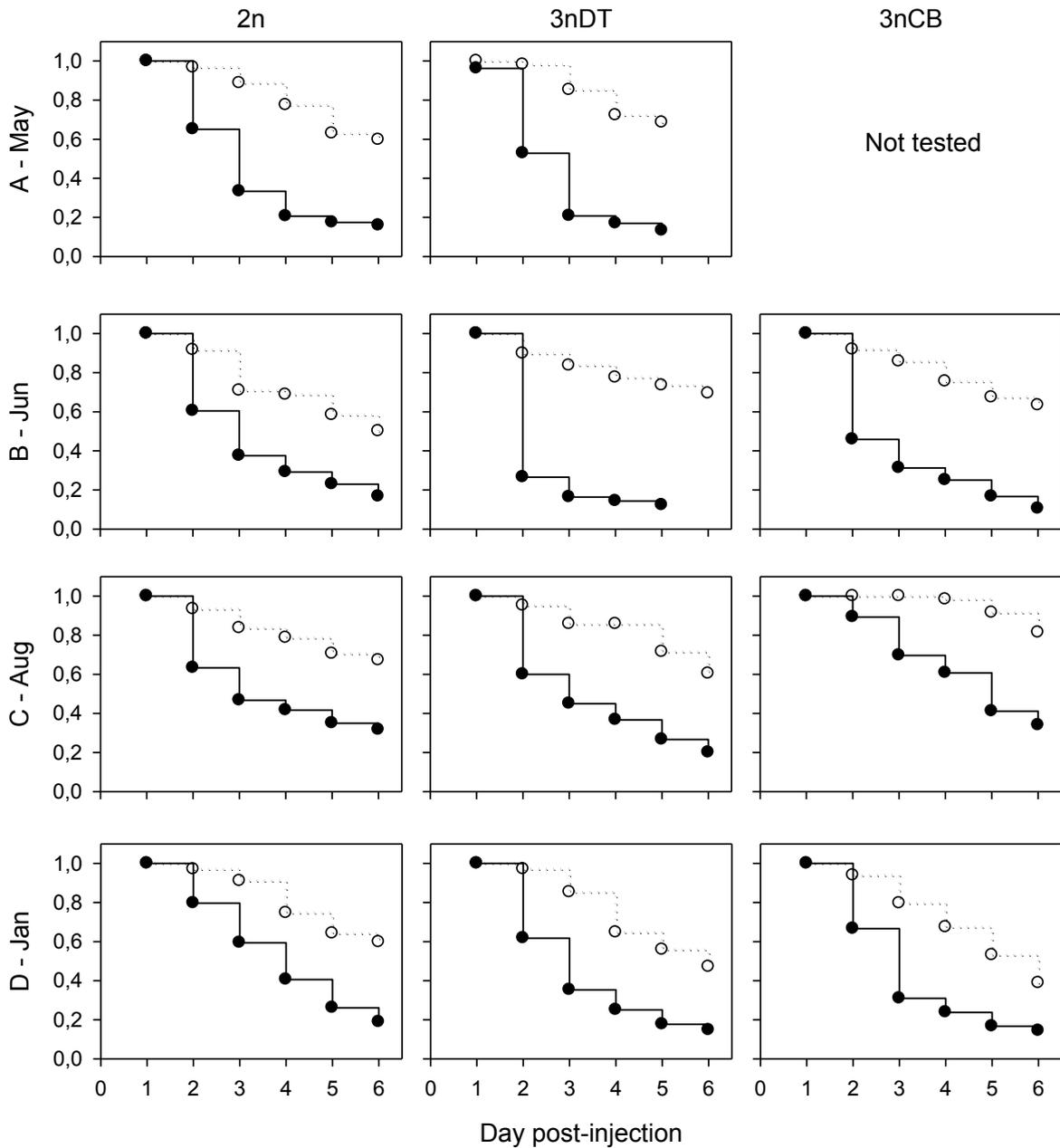


Fig. 3: Kaplan-Meier estimate of the survival distribution function obtained each day in the three tanks used per treatment, for the three groups injected with the two injection doses. The lower dose is represented by a dotted line (...), the higher dose (-) by a solid line.

The survival kinetics comparisons within groups and their mean survival times are presented in Fig. 3 and Figs 4A & 4B, respectively.

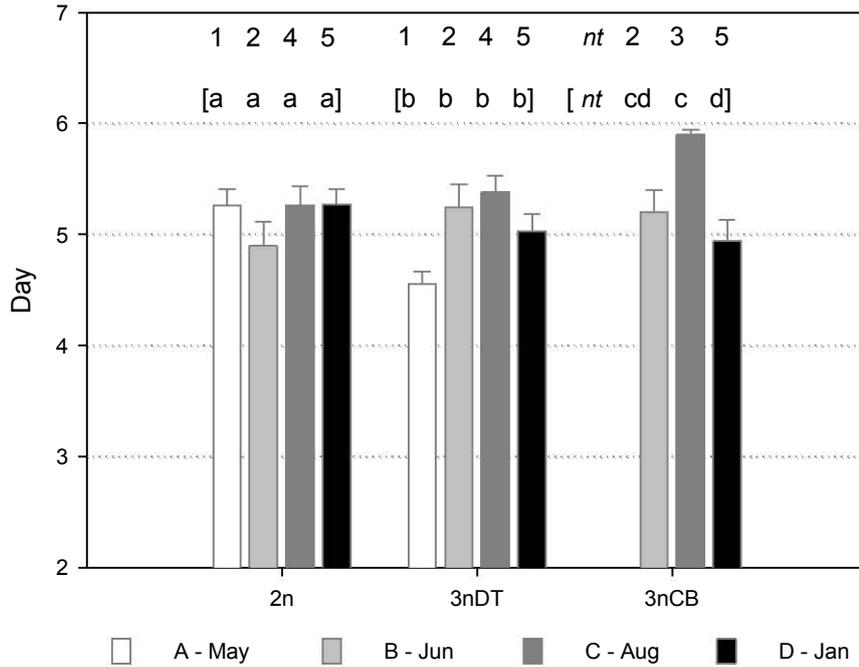
For the lower dose and for 2n oysters, the mean survival time calculated at the date B was substantially lower than at the other dates, even though the survival kinetics obtained were not statistically different between infection dates (date A: 5.3 ± 0.2 days, date B: 4.9 ± 0.2 days, date C:

5.3 ± 0.2 days, date D: 5.3 ± 0.1 days) (Fig. 4A). At the higher dose, the mean survival time gradually rose from date A to date D, with increasing values from 3.4 ± 0.2 days (date A) to 4.1 ± 0.1 days (date D). For this dose, survival kinetics of diploid oysters obtained at date D were significantly different from those obtained at dates A ($p = 0.0108$) and B ($p = 0.0447$) and similar to the one obtained at date C (although C was similar to those obtained at the dates A and B) (Fig. 4B).

In the same way, the survival kinetics obtained within 3nDT oysters were not statistically different from each other at the lower dose, with a minimum mean survival time at date A reaching 4.6 ± 0.1 days. The mean survival times calculated at dates B, C and D were 5.2 ± 0.2 days, 5.4 ± 0.2 days and 5.0 ± 0.1 days, respectively (Fig. 4A). At the higher dose, survival kinetics within 3nDT at the date B were significantly different to those observed at dates C ($p = 0.0022$) and D ($p = 0.0022$), which were similar to each other. The survival distribution function obtained at date A is similar to those obtained at dates B, C and D. The mean survival times calculated at dates C (3.7 ± 0.2 days) and D (3.4 ± 0.2 days) was higher than those calculated at dates A (2.9 ± 0.2 days) and B (2.6 ± 0.2 days) (Fig. 4B).

The same pattern of survival distribution functions was observed at both doses for the 3nCB group, and the kinetic obtained at date C for the higher dose was significantly different from those calculated at date B ($p < 0.0001$) and date D ($p = 0.0002$) (Figs 4A & 4B). The maximum survival times for both doses were found at date C (lower dose: 5.9 ± 0.05 days; higher dose: 4.6 ± 0.2 days). At date B, survival reached 5.2 ± 0.2 days at the lower dose and 3.2 ± 0.2 days at the higher dose, while at date D it was 4.9 ± 0.2 days at the lower dose and 3.4 ± 0.2 days at the higher dose (Fig. 4B).

A.



B.

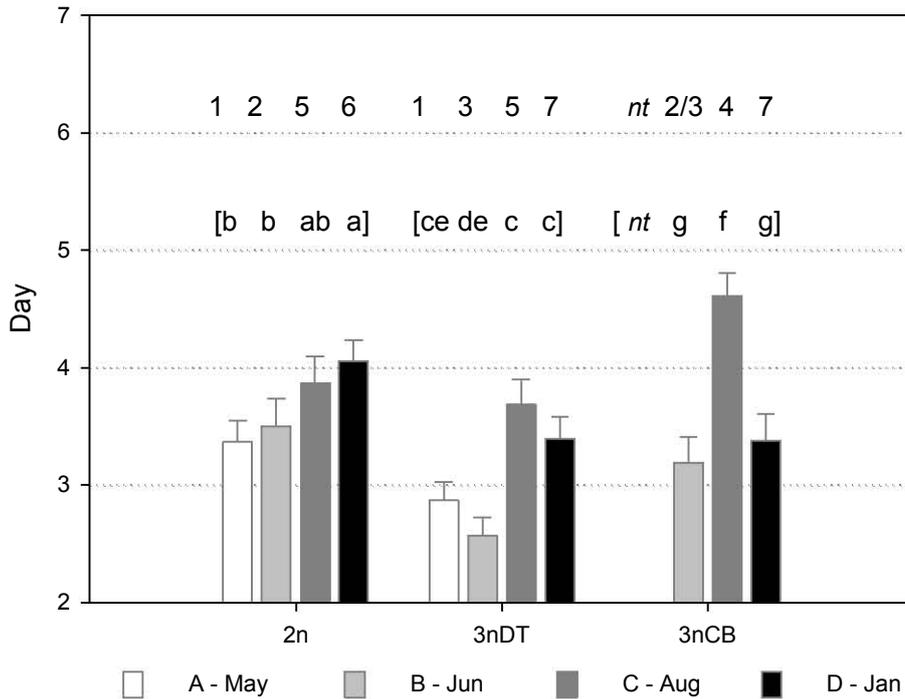


Fig. 4: Mean (\pm SE) survival times calculated from the Kaplan-Meier survival distribution functions in the three tanks used per date (A, B, C, D) for the three groups, 2n, 3nDT and 3nCB, injected with the lower dose (A) and the higher dose (B) of *Vibrio* strains. "nt" means "not tested". Comparisons between survival curves were performed for each dose with the Wilcoxon test: i. the equivalence between the survival curves among groups at a common infection date is represented by Arabic numerals, ii. the equivalence between the survival curves within groups (each group separately, 2n, 3nDT or 3nCB) is represented by letters.

Comparisons of survival kinetics among groups and mean survival times are presented in Figs 3, 4A & 4B.

The survival kinetics obtained for 2n and 3nDT groups at date A were statistically similar to each other for both doses (lower dose: $p = 0.6119$; higher dose: $p = 0.1298$). However, the mean survival time obtained for the 2n group (5.3 ± 0.2 days at the lower dose and 3.4 ± 0.2 days at the higher dose) was higher than that obtained for the 3nDT group (4.6 ± 0.1 days at the lower dose and 2.9 ± 0.2 days at the higher dose) (Figs 4A & 4B).

At date B, the 3nDT group presented a lower mean survival time than the 2n group at the higher dose ($p = 0.053$) (2n: 3.5 ± 0.2 days, 3nDT: 2.6 ± 0.2 days, 3nCB: 3.2 ± 0.2 days) whereas the other survival functions obtained for the three groups are alike for both doses (Figs 4A & 4B).

In experimental infection C, the 3nCB group survival functions were significantly different from those of the 2n (lower dose: $p = 0.0230$, higher dose: $p = 0.0325$) and 3nDT groups (lower dose: $p = 0.0046$; higher dose: $p = 0.0023$). Mean survival times for the 3nCB group at this date were 5.9 ± 0.05 days after the lower injection dose and 4.6 ± 0.2 days after the higher injection dose (Figs 4A & 4B). The survival functions obtained at both doses for the 2n group (lower dose: 5.3 ± 0.2 days; higher dose: 3.9 ± 0.2 days) were similar to those obtained for the 3nDT group (lower dose: 5.4 ± 0.1 days; higher dose: 3.7 ± 0.2 days).

At date D, the 2n group survival function obtained at the higher dose was significantly different from the triploid groups (2n vs. 3nCB group: $p = 0.0241$; 2n vs. 3nDT group: $p = 0.0114$), and the 2n mean survival time (4.1 ± 0.2 days) was higher than those of 3nDT (3.4 ± 0.2 days) and 3nCB (3.4 ± 0.2 days). At this date, the same order was obtained at the lower dose, with 2n mean survival time at 5.3 ± 0.2 days, 3nDT at 5.0 ± 0.2 days and 3nCB at 4.9 ± 0.2 days (Figs 4A & 4B).

4. Discussion

4.1. Potential and limitations of bath challenges *versus* injection

Experimental infections of aquatic animals using viruses, bacteria or parasites can be performed to fulfil different objectives: to estimate the efficiency of preventive treatments, study routes of infection, test the resistance of selected lines (Gomez-Leon et al., 2008; Goyard et al., 2008; Lallias et al., 2008) or different ploidy groups (Ching et al., 2009; O'Flynn et al., 1997), and to assess host factors linked to susceptibility (Goarant et al., 1998; Goarant et al., 2006b; Labreuche et al., 2006a). For bacteria, experimental infections are also often used to explore pathogenicity (Gay *et al.*, 2004; Goarant *et al.*, 2006b), coupled with phenotypic and/or molecular characterization of virulence factors. Such experiments are used in epidemiological studies to assess the dynamics of infectious diseases (Goarant et al., 2006a; Guisande et al., 2008; Saulnier et al., 2000).

The best testing method may be co-habitation, bath or injection challenge, depending on objectives, analytical plan and biological characteristics of hosts and pathogens. In the case of *V. splendidus* or *V. aestuarianus* and Pacific oyster *C. gigas*, the bath method led to no vibriosis-induced mortality in groups of non sexually mature oysters (Labreuche *et al.*, 2006a) and personal observations). As this type of protocol leads to significant mortality in other species (Farto et al., 2003; Kettunen and Fjalestad, 2006; Løvoll et al., 2009; Planas et al., 2005; Travers et al., 2008), the negative results obtained with *C. gigas* and *Vibrio* indicate the complex nature of infection processes in this model. However, the success of our bath experiment, carried out using sexually mature oysters led, for the first time, to significant mortality compared with controls, highlighting the importance of the stage of sexual maturity for *Vibrio* infection processes in oysters. However, our bath challenge protocol showed poor repeatability between tanks. It appeared that this method did not create a common challenge to all animals, probably due to the multiplicity of events which could have occurred between the time the water was contaminated and the moment when the *Vibrio* entered the oyster. Moreover, we cannot exclude the possibility that the artificial reproduction conditioning might have had an effect on immune-physiological status and susceptibility to vibriosis of tested oysters. Nonetheless, this bath protocol could be used to map the route of *Vibrio* infection on both spatial and temporal scales. The observed success of our bath protocol in presence of mature and spawning animals led us to focus on the links between reproduction and survival to vibriosis on related diploid and triploid oysters at different stages of their reproductive cycle, using a standardized injection protocol.

Considering the implication of *Vibrio splendidus* and *V. aestuarianus* in *C. gigas* mortality events of the Pacific oyster *C. gigas*, a reproducible experimental co-infection model was recently developed in order to provide an integrative tool for the better understanding of summer mortality (Saulnier *et al.*, 2010). In the present study, experimental infections were carried out paying particular attention to the reproducibility of all controllable parameters: preparation of the inocula, injection procedures, density, seawater quality, tanks, temperature, aeration, mortality survey specification. We ensured that all animals were at equal risk of being infected by using the same amount of bacterial inoculum at the four different dates over the year. Moreover, the fact that no mortality was observed in control tanks during any of the injection experiments strongly suggests that the mortality in *Vibrio* challenge tanks was due to the injected *Vibrio* mix. Furthermore, we verified with the plate-counting method and molecular diagnostic tests that haemolymph samples from some freshly dead oysters harboured dominant bacteria belonging to the same species as those injected (data not shown), fulfilling one of the Koch's postulates and confirming the *Vibrio* infection was the cause of death. Besides these verifications, the clear dose effect, observed at each date, confirmed *Vibrio* infection. In the light of these results, we can be confident that experimental injections were performed under as uniform conditions as possible, allowing an objective comparison of the four sampling dates.

Nevertheless, although survival of control oysters injected with sterile artificial seawater was not affected (i.e. 100 % survival rates observed at each condition), it is obvious that this procedure of experimental infection is invasive and bypasses the natural means of entrance of virulent *Vibrio* into the host tissues and, in this way, bypasses the first lines of defence. However, even though this injection procedure does not mimic the natural route of infection, it allowed experimental co-infection to be tested in a way that led to repeatable vibriosis mortality results. This allowed us to further investigate to importance of reproductive status, modulated by ploidy and time, on resistance to vibriosis.

Lastly, summer mortality under natural conditions arises from a complex interaction of factors (Samain and McCombie, 2008) that we cannot claim to have reproduced under experimental conditions. We worked under controlled experimental conditions to assess the effect of sexual maturity and ploidy, both of which appear to be relevant. It should also be noted also that we cannot totally exclude the implication of other factors that covaried over time with the reproductive status of the studied oysters.

4.2. Statistical analysis of survival kinetics

The final general Cox model using TPHREG procedures (Cox, 1972) allowed us to quantitatively examine the overall relationship between susceptibility of challenged oysters and several chosen

factors. The power and originality of this procedure lies in its use of categorical variables and interactions. It computes statistical tests using realistic degrees of freedom and is therefore the procedure best suited to our data, although it is still in the testing phase. Similar results were obtained using the more classical PHREG procedure (data not shown). This type of analysis has rarely been used on aquatic animals, although it is widely applied in medical statistics as it provides the hazard ratio – or the risk of death – assessment, according to treatment and prognostic variables (Arriagada et al., 2009; Kwok et al., 2010).

These analyses confirmed the value of this kind of experimental challenge tool, indicating that it could be adapted and integrated into multidisciplinary studies on shellfish mortality events and used to identify host factors and interactions that influence bacterial virulence and aggravate infectious disease.

In further studies, growth could be monitored to improve the interpretation of variability of survival, although no clear differences in growth pattern were detected between groups. Similar trends were observed regarding summer mortality of oysters in the field (Dégremont *et al.*, 2005). The inclusion of individual quantitative phenotypic data describing sexual maturation or somatic growth in the general model would allow the relationship between survival and reproductive effort to be assessed at an individual scale. Such data is not easy to obtain, as non-destructive methods to quantify reproductive status of oysters are still in development (Davenel *et al.*, 2006).

4.3. Relation between reproductive status, triploidy and survival of *Vibrio* challenges

4.3.1. Sexual maturity increases oyster susceptibility to vibriosis

As already mentioned, the present study, examining the reaction of sexually mature oysters to bath challenge, revealed significant mortality. Even though the *Vibrio* entry route remains to be identified, numerous *V. splendidus*-GFP bacteria were specifically detected in gonadic tissues, using the specific immunohistochemical method (Fig. 1B). The organisation in foci reinforces the hypothesis that *Vibrio* has an affinity for this kind of tissue. Gonadic tissue could constitute both a facilitated route of entrance and a highly nutritive tissue, favourable to *Vibrio* infection and establishment. Following this hypothesis, *Vibrio* infection could be considerably amplified by high gonadic tissue weight, which can account for up to 86 % of the individual body weight at maturity (Deslous-Paoli and Héral, 1988; Enríquez-Díaz *et al.*, 2009). Even though mortality rates were variable among tanks, this new result underlines the involvement of sexual maturity in oyster susceptibility to vibriosis; more precisely the transmissibility of *Vibrio* within oysters through gonadic tissue or between oysters *via* spawning. Nevertheless, considering the complexity of infection processes, we cannot use such an approach to define the precise mechanism that compromises the immune responses of *C. gigas*. However, it is

interesting to note there that extracellular proteases, e.g. metalloproteases, could facilitate the invasion process in gonadic tissue due to their proteolytic activity. Metalloproteases are (1.) known to be involved in tissue invasion and the modulation and/or destruction of host defence (Travis et al., 1995); (2.) described in both of the studied strains of *V. splendidus* and *V. aestuarianus* pathogenic to *C. gigas*, as essential determinants of virulence (Binesse et al., 2008; Labreuche et al., 2006b); and (3.) are a common feature of pathogenic bacteria strains associated with mortality events in *C. gigas* reared in France (Saulnier et al., 2010). The affinity of the bacteria for gonadic tissues underlined in the present study should probably be considered as an aggravating factor that acts in synergy with energetic re-allocation from survival to reproduction to increase oyster vulnerability to vibriosis.

The significant variations in resistance to experimental infections over the reproductive cycle could be linked to sexual maturation. One major trend is the increase of survival at date C compared with dates A and B, observed for all the three groups and both treatments. Considering the trade-off between reproduction and survival in *C. gigas*, it is tempting to correlate this date effect with reproductive status and interpret this variation of susceptibility as an effect of the sexual maturation on survival performances. Diploid individuals are indeed known to make a high energetic allocation to reproductive tissues, (estimated at 55 % of the annual energy budget) (Van der Meer, 2006). Such a reproductive effort could result in physiological weakness that prevents oysters from responding efficiently to vibriosis infection; this has been widely evoked as a part of the explanation for summer mortality of cultured oysters in France (Delaporte et al., 2006; Duchemin et al., 2007; Gagnaire et al., 2006; Li et al., 2009a; Pouvreau and Lepenne, 2006; Soletchnik et al., 1997). Interestingly, lower phagocytic activity and adhesive capacity of oyster haemocytes were reported during the reproductive season (Delaporte et al., 2006; Gagnaire et al., 2006; Li et al., 2009b). Furthermore, energy balance probably did not explain all costs at the mature stage. The very high gonad development in *C. gigas* may result in mechanical difficulties, as gonad size and density probably affect haemolymph circulation (Tran et al., 2008). We suspect that the observed decrease in resistance to experimental infection during the period of active gonadogenesis is due to both the energetic and mechanic disturbance caused by gonad formation.

This interpretation is mainly based on the observed covariation between mean group GO and survival at any given time, although alternative experimental approaches could be used to test for a causal relationship between gonad development dynamics and increasing susceptibility to summer mortality. The production of divergent lines for reproductive allocation (Normand, 2009) or resistance to summer mortalities (Dégremont et al., 2007) could also constitute interesting material to further investigate this point, especially as a genetic correlation has been observed between these two traits (Ernande et al., 2004; Huvet et al., 2010).

4.3.2. Triploid responses to experimental vibriosis: indications of sexual maturation costs

Considering the whole sampling period and both triploid groups, we did not observe higher survival in triploid individuals than in diploid ones. This result leads to the conclusion that the reduction of gonadic development in triploid oysters does not lead to a significant improvement of resistance to experimental vibriosis. Under natural conditions, previous studies reported variable results on the relative resistance of diploid and triploid oysters to summer mortality (Allen and Downing, 1986; Cheney et al., 2000; Gagnaire et al., 2006; Garnier-Géré et al., 2002). As triploid oysters often show better growth than diploids (Allen and Downing, 1986; Nell and Perkins, 2005), this is commonly presumed to be mainly related to energy reallocation from gonadic development to somatic growth.

In our second experiment, at date C, both types of triploid oysters showed a similar higher resistance to experimental vibriosis compared with diploids. This result was not repeated on the other dates, suggesting that triploid oysters might have reduced resistance during the reproductive period, possibly due to some sort of reproductive cost. This hypothesis is supported by the fact that histological analysis revealed a significant development of gonadic tissue in both triploid groups, indicating a significant allocation to reproduction in these individuals, as reported in some previous studies (Allen and Downing, 1990; Normand et al., 2009). Additionally, it is probable that the measurements of gonadic occupation did not fully reflect the amount of energy devoted to reproduction in triploid oysters, notably because they have the tendency to resorb reproductive tissue before reaching full maturity (Allen and Downing, 1990; Normand et al., 2008; Shpigel et al., 1992). Clearly, such spontaneous atresia tends to disconnect the measured GO at a given time from the true allocation to reproduction, which would be underestimated in this case.

Moreover, histological observations of atresic tissues in diploid and triploid oysters typically showed massive haemocyte infiltrations, which could be interpreted as an inflammatory phenomenon that could also lead to excess costs, independent of energetic allocation to reproduction (Delaporte et al., 2007). Knowing that such reproductive tissue degeneration processes are far more common in triploid than in diploid oysters (Allen and Downing, 1990; Shpigel et al., 1992), the disturbed reproductive tissue development in triploid oysters might result in some additional underestimated costs. It appears difficult in this context to precisely estimate the energetic allocation to reproduction in triploid individuals, a practical problem that was already pointed out in a previous study (Normand et al., 2009). Our experimental approach of estimating allocation to reproduction by direct measure of gonad development and maturity and measuring the costs paid by physiological covariates like survival goes some way to offering a solution to this problem.

4.3.3 Evidence for winter depression in triploid oysters

Ultimately, the two triploid groups appeared more susceptible to experimental vibriosis infection at date D (resting period) than at date C, while this was not the case for the diploid oysters, which showed a gradual increase in survival during the autumn and winter period. This suggests an intrinsic weakness of triploid oysters at a time when diploid survival remains unaffected by the costs of reproductive activity. Following this hypothesis, another physiological function could be acting as an energetic sink in triploid oysters, meaning that these individuals require more resources to survive. Such a hypothesis, of an extra maintenance cost in triploid oysters during the winter season, could also explain the recurrent reports of high autumnal weight loss in these individuals or unexpected consumption of carbohydrate reserves (Allen and Downing, 1986; Lambert et al., 2008). In fact, some evidence already suggests that induced triploidy could lead to general detrimental effects on growth and survival. In fish, triploid individuals are generally surpassed by their diploid counterparts until they gain an advantage from their reduced reproductive development (Piferrer et al., 2009). Growth and survival is slightly depressed in triploid salmonids, but they usually overtake diploid individuals when the latter reach sexual maturity (Chourrout et al., 1986; Quillet et al., 1988). Experimental *Vibrio* challenges conducted on diploid and triploid Chinook salmon also illustrate reduced performance of triploid individuals (Ching et al., 2009).

However, previous studies have proposed that improved growth in triploid molluscs could be explained by an increase in net energy budget (Hawkins et al., 2000; Hawkins et al., 1994; Wang et al., 2002), a phenomenon independent of energetic re-allocation from reproduction to other functions. Such results have been thought to be due to increased heterozygosity in polyploid individuals, suggesting that triploidy could confer an advantage *per se* on growth and survival through the increase of intra-individual allelic diversity and the optimisation of energy balance (Hawkins et al., 2000). Other studies found conflicting results, with very few differences in energy budget detected between diploid and triploid Sydney rock oysters (Kesarcodi-Watson et al., 2001a; Kesarcodi-Watson et al., 2001b) or clams (Mason et al., 1988). These authors explained the observed difference in growth rates as the result of re-allocation from reproduction. At present, the hypothesis of a *per se* triploid survival advantage appears doubtful in molluscs.

5. Conclusion

To summarize, we propose a scenario linking our experimental observations with the summer mortality episodes observed under natural environmental conditions. Working at different dates over a year on oysters issued from one controllable experimental production and reared under common

environmental condition allowed us to better document the effect of reproduction on oyster resistance to *Vibrio* challenge. During the period of active sexual maturation, survival performances in oysters challenged with experimental vibriosis were lower than those recorded after spawning. This suggests that the individual resistance to a pathogenic threat varies through the year as a result of a physiological trade-off between reproduction and survival. We suspect that such a trade-off is primarily made up of energetic components, but is also influenced by additional components that are independent of energetic allocation. Previously published studies have already pointed out the fact that this summer period of physiological weakness probably coincides with a period when exogenous stresses (temperature, pollutants) (Samain and McCombie, 2008) and pathogenic pressures (Thompson et al., 2006) are exacerbated. The conjunction of increased susceptibility of the host and environmental and pathogenic stressors results in the mass mortalities observed in reared stocks of *C. gigas*.

We found that despite their reduced reproductive tissue development, triploid individuals did not show better performances than diploid ones when considering the entire period of the study. This could be due to underestimated costs of reproductive activity for triploid oysters. Reduced triploid survival performances in winter also suggest an intrinsic depression in triploid performance compared with diploids, potentially compensated during the reproductive period. In this case, although winter would correspond to a period of physiological weakness in triploid oysters, this probably does not lead to such heavy mortality as that observed in summer because the pathogen pressure is lower.

Acknowledgements

We are grateful to the hatchery teams at the La Tremblade and Bouin Ifremer stations for their help with the production of the oysters used in the present study. We thank Dr. Frédérique Le Roux (Harvard Medical School, formerly at Institut Pasteur) for providing the *Vibrio splendidus* LGP32 mutated strain expressing a resistance to chloramphenicol antibiotic and a Green Fluorescent Protein. Thanks also to Patrick Soletchnik and Nicolas Taris for their analytical contribution and to Philippe Haffner and Emmanuelle Omnes for their technical help. We are particularly grateful to Ismaël Bernard for his help and support on theoretical ecophysiology background, Ronan Becheler for writing suggestions, Yann Reynaud for critical reading of the manuscript and Helen McCombie for help with the English.

References

- Allen, S. K., 1983. Flow cytometry: assaying experimental polyploidy fish and shellfish. *Aquaculture*. 33, 317-328.
- Allen, S. K., Downing, S. L., 1986. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 102, 197-208.
- Allen, S. K., Downing, S. L., 1990. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: Gametogenesis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 1213-1222.
- Arriagada, R., Dunant, A., Pignon, J.-P., Bergman, B., Chabowski, M., Grunenwald, D., Kozlowski, M., Le Pechoux, C., Pirker, R., Pinel, M.-I. S., Tarayre, M., Le Chevalier, T., 2009. Long-Term Results of the International Adjuvant Lung Cancer Trial Evaluating Adjuvant Cisplatin-Based Chemotherapy in Resected Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* 28, 35-42.
- Beattie, J. H., Chew, K. K., Hershberger, W. K., 1980. Differential survival of selected strains of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during summer mortality. *Proc. Natl. Shellfish Assoc.* 70, 184-189.
- Binesse, J., Delsert, C., Saulnier, D., Champomier-Verges, M. C., Zagorec, M., Munier-Lehmann, H., Mazel, D., Le Roux, F., 2008. The metalloprotease Vsm is the main toxic factor for *Vibrio splendidus* extracellular products. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7108-17.
- Boudry, P., Dégremont, L., Haffray, P., The genetic basis of summer mortality in Pacific oyster and potential for improving survival by selective breeding in France. In: J. F. Samain, H. McCombie, (Eds.), *Summer mortality of Pacific oyster Crassostrea gigas*. The Morest Project, Editions Ifremer/Quae, Paris, 2008, pp. 153-196.
- 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, 721-731.
- Cheney, D. P., MacDonald, B. F., Elston, R. A., 2000. Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *J. Shellfish Res.* 19, 353-359.
- Ching, B., Jamieson, S., Heath, J. W., Heath, D. D., Hubberstey, A., 2009. Transcriptional differences between triploid and diploid Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) during live *Vibrio anguillarum* challenge. *Heredity.* 104, 224.
- Chourrout, D., Chevassus, B., Krieg, F., Happe, A., Burger, G., Renard, P., 1986. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females — Potential of tetraploid fish. *Theor. Appl. Genet.* 72, 193-206.

- Cox, D. R., 1972. Regression Models and Life-Tables. *J. R. Stat. Soc.* 34, 187-220.
- Davenel, A., Quellec, S., Pouvreau, S., 2006. Noninvasive characterization of gonad maturation and determination of the sex of Pacific oysters by MRI. *Magn. Reson. Imaging.* 24, 1103.
- 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.
- Dégremont, L., Ernande, B., Bédier, E., Boudry, P., 2007. Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth. *Aquaculture.* 262, 41-53.
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Jegaden, M., Moal, J., Pouvreau, S., Dégremont, L., Boudry, P., Samain, J.-F., 2007. Characterisation of physiological and immunological differences between Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities and fed different rations under controlled conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 353, 45-57.
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Moal, J., Pouvreau, S., Samain, J.-F., 2006. Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture.* 254, 571-582.
- Deslous-Paoli, J.-M., Héral, M., 1988. Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. *Aquat. Living Resour.* 1, 239-249.
- Duchemin, M. B., Fournier, M., Auffret, M., 2007. Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture.* 264, 73-81.
- Enríquez-Díaz, M., Pouvreau, S., Chávez-Villalba, J., Le Pennec, M., 2009. Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquacult. Int.* 17, 491.
- Ernande, B., Boudry, P., Clobert, J., Haure, J., 2004. Plasticity in resource allocation based life history traits in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Spatial variation in food abundance. *J. Evol. Biol.* 17, 342-356.
- Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M., Pouvreau, S., 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture.* 250, 458-470.
- Farto, R., Armada, S. P., Montes, M., Guisande, J. A., Pérez, M. J., Nieto, T. P., 2003. *Vibrio lentus* associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*). *J. Invertebr. Pathol.* 83, 149-156.
- Gagnaire, B., Soletchnik, P., Madec, P., Geairon, P., Le Moine, O., Renault, T., 2006. Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: Difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. *Aquaculture.* 254, 606-616.

- Garnier-Géré, P. H., Naciri-Graven, Y., Bougrier, S., Magoulas, A., Héral, M., Kotoulas, G., Hawkins, A., Gérard, A., 2002. Influences of triploidy, parentage and genetic diversity on growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* reared in contrasting natural environments. *Mol. Ecol.* 11, 1499-1514.
- 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.
- Gay, M., Berthe, F. C., Le Roux, F., 2004. Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.* 59, 49-56.
- Gérard, A., Ledu, C., Phélipot, P., Naciri-Graven, Y., 1999. The induction of MI and MII triploids in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with 6-DMAP or CB. *Aquaculture.* 174, 229-242.
- Goarant, C., Ansquer, D., Herlin, J., Domalain, D., Imbert, F., De Decker, S., 2006a. "Summer Syndrome" in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture.* 253, 105-113.
- Goarant, C., Régnier, F., Brizard, R., Marteau, A.-L., 1998. Acquisition of susceptibility to *Vibrio penaeicida* in *Penaeus stylirostris* postlarvae and juveniles. *Aquaculture.* 169, 291-296.
- Goarant, C., Reynaud, Y., Ansquer, D., De Decker, S., Saulnier, D., Roux, F. I., 2006b. Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 570-580.
- Gomez-Leon, J., Villamil, L., Salger, S. A., Sallum, R. H., Remacha-Trivino, A., Leavitt, D. F., Gomez-Chiarri, M., 2008. Survival of eastern oysters *Crassostrea virginica* from three lines following experimental challenge with bacterial pathogens. *Dis. Aquat. Org.* 79, 95-105.
- Goyard, E., Goarant, C., Ansquer, D., Brun, P., de Decker, S., Dufour, R., Galinié, C., Peignon, J.-M., Pham, D., Vourey, E., Harache, Y., Patrois, J., 2008. Cross breeding of different domesticated lines as a simple way for genetic improvement in small aquaculture industries: Heterosis and inbreeding effects on growth and survival rates of the Pacific blue shrimp *Penaeus (Litopenaeus) stylirostris*. *Aquaculture.* 278, 43-50.
- Guisande, J. A., Perez Lago, E., Prado, S., Nieto, T. P., Farto Seguin, R., 2008. Genotypic diversity of culturable *Vibrio* species associated with the culture of oysters and clams in Galicia and screening of their pathogenic potential. *J. Shellfish Res.* 27, 801-809.
- Guo, X., DeBrosse, G. A., Allen, S. K., 1996. All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. *Aquaculture.* 142, 149-161.
- Hawkins, A., Magoulas, A., Héral, M., Bougrier, S., Naciri-Graven, Y., Day, A. J., Kotoulas, G., 2000. Separate effects of triploidy, parentage and genomic diversity upon feeding behaviour, metabolic efficiency and net energy balance in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genet. Res.* 76, 273-284.

- Hawkins, A. J. S., Day, A. J., Gérard, A., Naciri, Y., Ledu, C., Bayne, B. L., Héral, M., 1994. A genetic and metabolic basis for faster growth among triploids induced by blocking meiosis I but not meiosis II in the larviparous European flat oyster, *Ostrea edulis* L. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 184, 21-40.
- Huvet, A., Normand, J., Fleury, E., Quillien, V., Fabioux, C., Boudry, P., 2010. Reproductive effort of Pacific oysters: A trait associated with susceptibility to summer mortality. Aquaculture. 304, 95-99.
- Kaplan, E. L., Meier, P., 1958. Nonparametric estimation from incomplete observations. J. Am. Stat. Assoc. 53, 457-481.
- Kesarcodi-Watson, A., Klumpp, D. W., Lucas, J. S., 2001a. Comparative feeding and physiological energetics in diploid and triploid Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*): II. Influences of food concentration and tissue energy distribution. Aquaculture. 203, 195.
- Kesarcodi-Watson, A., Lucas, J. S., Klumpp, D. W., 2001b. Comparative feeding and physiological energetics of diploid and triploid Sydney rock oysters, *Saccostrea commercialis*: I. Effects of oyster size. Aquaculture. 203, 177.
- Kettunen, A., Fjalestad, K. T., 2006. Resistance to vibriosis in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): First challenge test results. Aquaculture. 258, 263-269.
- Kooijman, S. A. L. M., 2000. Dynamic energy and mass budgets in biological systems. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Kwok, J., Langevin, S. M., Argiris, A., Grandis, J. R., Gooding, W. E., Taioli, E., 2010. The impact of health insurance status on the survival of patients with head and neck cancer. Cancer. 116, 476-485.
- Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A., Nicolas, J. L., 2006a. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. Microbes Infect. 8, 2715-24.
- Labreuche, Y., Soudant, P., Goncalves, M., Lambert, C., Nicolas, J. L., 2006b. 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, 367-79.
- 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. Org. 46, 139-45.
- Lallias, D., Arzul, I., Heurtebise, S., Ferrand, S., Chollet, B., Robert, M., Beaumont, A. R., Boudry, P., Morga, B., Lapègue, S., 2008. Bonamia ostreae-induced mortalities in one-year old European flat oysters *Ostrea edulis*: experimental infection by cohabitation challenge. Aquat. Living Resour. 21, 423-439.

- Lambert, C., Moal, J., Le Moullac, G., Pouvreau, S., Les risques associés à la physiologie de l'huître en période de reproduction. In: J. Samain, H. McCombie, (Eds.), Mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Défi Morest, Ifremer/Quae, Paris, 2008, pp. 153-196.
- Lango-Reynoso, F., Chávez-Villalba, J., Cochard, J. C., Le Pennec, M., 2000. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture. 190, 183-199.
- 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, Y., Qin, J. G., Li, X., Benkendorff, K., 2009a. Monthly variation of condition index, energy reserves and antibacterial activity in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in Stansbury (South Australia). Aquaculture. 286, 64-71.
- Li, Y., Qin, J. G., Li, X., Benkendorff, K., 2009b. Spawning-dependent stress response to food deprivation in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Aquaculture. 286, 309-317.
- Littel, R., Stroup, W., Freund, J., 2002. SAS for Linear Models, Fourth Edition., Cary, NC, USA.
- Løvoll, M., Wiik-Nielsen, C. R., Tunsjø, H. S., Colquhoun, D., Lunder, T., Sørum, H., Grove, S., 2009. Atlantic salmon bath challenged with *Moritella viscosa* - Pathogen invasion and host response. Fish Shellfish Immunol. 26, 877-884.
- Mann, R., 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperature. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 59, 95-110.
- Mason, K. M., Shumway, S. E., Allen, S. K. J., Hidu, H., 1988. Induced triploidy in the soft-shelled clam *Mya arenaria*: energetic implications. Mar. Biol. 98, 519-582.
- Mori, K., 1979. Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. Mar. Biol. 53, 361-369.
- Nell, J. A., Perkins, B., 2005. Studies on triploid oysters in Australia: farming potential of all-triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Port Stephens, New South Wales, Australia. Aquac. Res. 36, 530-536.
- Normand, J., Déterminismes génétiques de l'allocation à la reproduction chez les huîtres creuses (*Crassostrea gigas*) triploïdes. Laboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER. Université de La Rochelle, France, 2009, pp. 224.
- Normand, J., Ernande, B., Haure, J., McCombie, H., Boudry, P., 2009. Reproductive effort and growth in *Crassostrea gigas*: comparison of young diploid and triploid oysters issued from natural crosses or chemical induction. Aquat. Biol. 7, 229-241.
- Normand, J., Le Pennec, M., Boudry, P., 2008. Comparative histological study of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) reared in an estuarine farming site in France during the 2003 heatwave. Aquaculture. 282, 124-129.

- O'Flynn, F. M., McGeachy, S. A., Friars, G. W., Benfey, T. J., Bailey, J. K., 1997. Comparisons of cultured triploid and diploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). ICES J. Mar. Sci. 54, 1160-1165.
- Perdue, J. A., Beattie, J. H., Kenneth, K. C., 1981. Some relationships between gametogenetic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington State. J. Shellfish Res. 1, 9-16.
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J.-C., Flajshans, M., Haffray, P., Colombo, L., 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. Aquaculture. 293, 125-156.
- Planas, M., Perez-Lorenzo, M., Antonio Vazquez, J., Pintado, J., 2005. A model for experimental infections with *Vibrio (Listonella) anguillarum* in first feeding turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae under hatchery conditions. Aquaculture. 250, 232-243.
- Pouvreau, S., Enriquez-Diaz, M., Le Souchu, P., Connan, J. P., Le Roy, B., Mingant, C., Moal, J., Delaporte, M., Le Coz, J. R., Samain, J. F., Reproduction, bioenergetic and summer mortality of *Crassostrea gigas*: experimental approach. In: N. S. Association, (Ed.), Annual Meeting of The National Shellfisheries Association, Vol. 22, New-Orleans, LA (USA), 2003, pp. 351.
- Pouvreau, S., Lepennec, M., 2006. Ecophysiology of the reproduction of cupped oyster, *Crassostrea gigas*. IFREMER.
- Quillet, E., Chevassus, B., Blanc, J., Krieg, F., Chourrout, D., 1988. Performances of auto and allotriploids in salmonids. I. Survival and growth in fresh water farming. Aquat. Living Resour. 1, 29-43.
- Renault, T., Le Deuff, R., Cochenec, N., Chollet, B., Maffart, P., 1995. 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. 26, 539-543.
- Samain, J. F., McCombie, H., 2008. Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. The Morest Project. 379p.
- 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.
- Saulnier, D., De Decker, S., Haffner, P., Cobret, L., Robert, M., Garcia, C., 2010. A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. Microb. Ecol. 59, 787-798.
- Saulnier, D., De Decker, S., Haffner, P., Duperthuy, M., Le Roux, F., Development of diagnostic tools for the detection of *Vibrio* species and pathogenic strains associated with mortalities of cultured pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in France. Vibrio 2007 meeting, Pasteur Institute, Paris (France), 2007, pp. 191.

- Saulnier, D., Haffner, P., Goarant, C., Levy, P., Ansquer, D., 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture*. 191, 133-144.
- Shpigel, M., Barber, B. J., Mann, R., 1992. Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology, and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 161, 15.
- Soletchnik, P., Lambert, C., Costil, K., 2005. Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to environmental rearing conditions. *J. Shellfish Res.* 4, 197-207.
- Soletchnik, P., Le Moine, O., Faury, N., Razet, D., Geairon, P., Gouletquer, P., 1999. Summer mortality of the oyster in the Bay Marennes-Oléron: Spatial variability of environment and biology using a geographical information system (GIS). *Aquat. Living Resour.* 12, 131-143.
- Soletchnik, P., Razet, D., Geairon, P., Faury, N., Gouletquer, P., 1997. Ecophysiologie de la maturation sexuelle et de la ponte de l'huître creuse *Crassostrea gigas*: réponses métaboliques (respiration) et alimentaires (filtration, absorption) en fonction des différents stades de maturation. *Aquat. Living Resour.* 10, 177-185.
- Soletchnik, P., Ropert, M., Mazurie, J., Fleury, P. G., Le Coz, F., 2007. Relationships between oyster mortality patterns and environmental data from monitoring databases along the coasts of France. *Aquaculture*. 271, 384-400.
- Stearns, S. C., 1976. Life-history tactics: A review of the ideas. *Q. Rev. Biol.* 51, 3-47.
- Thompson, F. L., Austin, B., Swings, J., 2006. *The biology of Vibrios*. American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- Tran, D., Massabuau, J.-C., Vercelli, C., 2008. Influence of sex and spawning status on oxygen consumption and blood oxygenation status in oysters *Crassostrea gigas* cultured in a Mediterranean lagoon (Thau, France). *Aquaculture*. 277, 58.
- Travers, M.-A., Basuyaux, O., Le Goic, N., Huchette, S., Nicolas, J.-L., Koken, M., Paillard, C., 2008. Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Glob. Chang. Biol.* 15, 1365-1376.
- Travis, J., Potempa, J., Maeda, H., 1995. Are bacterial proteinases pathogenic factors? *Trends Microbiol.* 3, 405-407.
- Van der Meer, J., 2006. An introduction to Dynamic Energy Budget (DEB) models with special emphasis on parameter estimation. *J. Sea Res.* 56, 85.
- Wang, Z., Guo, X., Allen, S. K., Wang, R., 2002. Heterozygosity and body size in triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg, produced from meiosis II inhibition and tetraploids. *Aquaculture*. 204, 337.

Conclusion et perspectives

Pour conclure, on peut tenter de transposer les résultats issus de ces expérimentations aux phénomènes de mortalités estivales observés dans le milieu naturel. En effet, travailler à différentes périodes de l'année sur des huîtres apparentées produites en conditions contrôlées et élevées dans un même environnement d'élevage a permis de documenter l'effet de la reproduction sur la résistance des huîtres à une vibriose expérimentale. Durant la période de gamétognèse active, les performances de survie des huîtres infectées sont réduites par rapport à celles enregistrées après la ponte. Cette variabilité des capacités de résistance au cours d'une année suggère l'existence d'un trade-off physiologique entre les fonctions de reproduction et de survie. De plus, ce compromis basé sur des composantes énergétiques, semble être également influencé par des paramètres additionnels indépendants des allocations énergétiques. Par ailleurs, malgré un développement gonadique réduit, les triploïdes ne présentent pas de meilleures performances que les diploïdes si l'on considère l'ensemble des expérimentations. Ceci peut être expliqué par une sous-estimation du coût de la reproduction chez les huîtres triploïdes ainsi que par les phénomènes d'atrésie. Enfin, les faibles survies obtenues en hiver chez les triploïdes comparées aux diploïdes, suggère une fragilité intrinsèque de ces triploïdes. On notera cependant que cette fragilité hivernale ne conduit pas à l'apparition de mortalité dans le milieu naturel en cette saison, durant laquelle par ailleurs, les concentrations des bactéries du genre *Vibrio* dans le milieu sont fortement diminuées (Maeda, *et al.*, 2003; Thompson, *et al.*, 2004b; Thompson, *et al.*, 2005; Turner, *et al.*, 2009; Vezzulli, *et al.*, in press).

Cette transposition reste évidemment imparfaite dans la mesure où les huîtres ont été testées aux quatre temps d'expérimentation à 20°C, après une période d'acclimatation de cinq jours. Par ailleurs, de précédentes études avaient montré le fait que la fragilité physiologique des huîtres en période estivale coïncidait avec une période durant laquelle les stress environnementaux (température, polluants) ou les pressions pathogéniques étaient exacerbés (Samain et McCombie, 2008). De plus, une récente étude portant sur l'influence de la température de l'eau sur les cinétiques de mortalité induites par une vibriose expérimentale montre clairement un effet de ce paramètre sur ces mortalités (Figure 43) : au cours de cette étude, les huîtres étaient soumises à ce même protocole de co-injection de *V. splendidus* et *V. aestuarianus* (deux doses testées), puis transférées dans des aquariums d'eau de mer maintenue à 10°C, 16°C et 22°C environ.

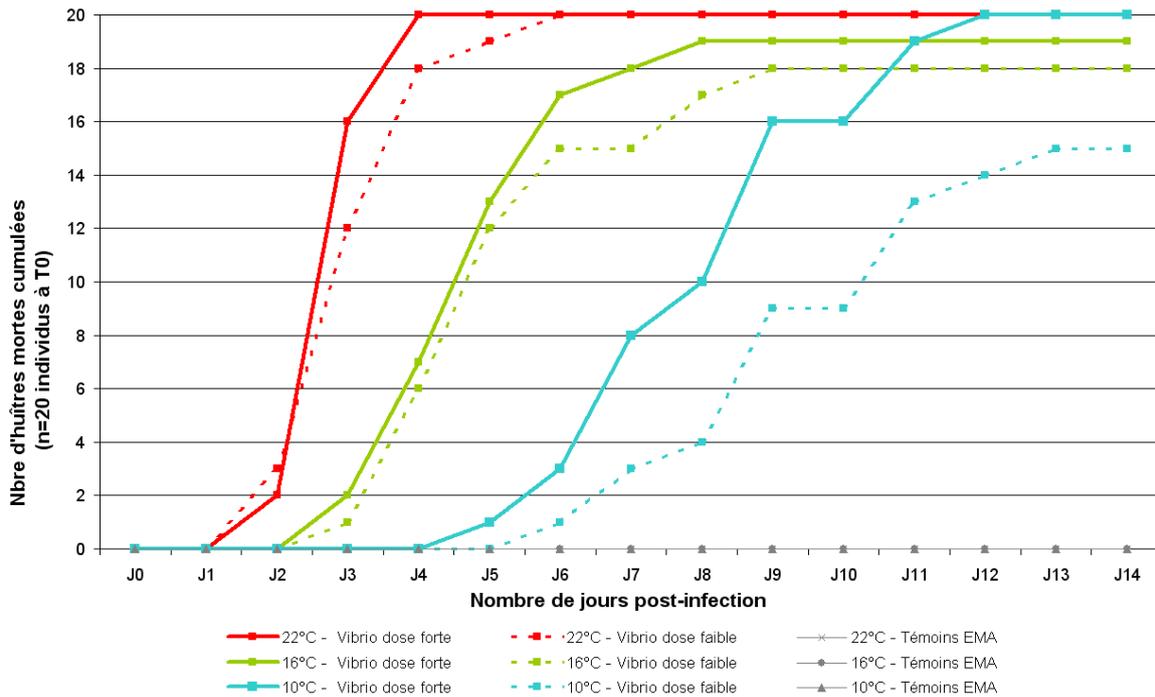


Figure 43 : Cinétique des mortalités d'huîtres induites par l'injection de vibrions pathogènes (*V. splendidus* et *V. aestuarianus*) dans des conditions de température différentes (10°C, 16°C et 22°C).

Les résultats montrent clairement que plus la température de l'eau des aquariums est basse, plus l'apparition des mortalités est tardive (Figure 43). Par ailleurs, les pentes des cinétiques de mortalité obtenues aux trois conditions de température révèlent des mortalités journalières d'autant plus faibles que la température de l'eau est basse. Cette étude réalisée récemment, du fait de la difficulté technique à maintenir trois températures différentes dans les infrastructures d'infection expérimentale, mérite d'être confirmée et ouvre des perspectives intéressantes sur l'étude de l'effet de la température sur les mécanismes de virulence des *Vibrio*.

Ainsi, la conjonction d'une sensibilité accrue de l'hôte diploïde ou triploïde et d'une virulence également accrue des *Vibrio* pathogènes, pourrait être à l'origine des mortalités massives observées dans les élevages de *C. gigas*.

Enfin, les effets de la taille et de l'âge des huîtres sur leur sensibilité aux vibrioses ont été abordés au cours des expérimentations de mises au point du protocole de cohabitation présenté dans le chapitre 3. Quatre cohabitations expérimentales ont été réalisées sur 10 lots d'huîtres diploïdes, d'âge variant de 8 mois à 30 mois, de provenances géographiques différentes (Méditerranée, Bassin de Marennes-Oléron) et issus de recrutements naturels ou de croisements d'écloserie. Ces huîtres ont été placées dans des aquariums en présence d'huîtres infectées expérimentalement par injection d'un mélange de *V. splendidus* et *V. aestuarianus*. Ces essais de cohabitation ont tous abouti à l'apparition

de mortalité de type vibriose et d'intensité similaire, et ce chez la totalité des lots testés. Aucune corrélation entre la sensibilité et l'âge ou la taille des huîtres testées n'ayant été mise en évidence dans ces conditions, l'influence de ces facteurs « âge » et « taille » n'a pas été davantage exploré au cours de ce travail. Par ailleurs, l'analyse de l'effet de ces deux facteurs nécessite du matériel biologique bien particulier, dont la production et l'élevage auront été contrôlés et homogénéisés. La taille dépendant de paramètres génétiques et environnementaux (écloserie, recrutement naturel, site de production, calendrier d'élevage), l'influence de ce paramètre sur la sensibilité des huîtres restera difficile à dissocier de ces interactions.

2 Résultats annexes : Résistance et Génétique

Introduction, objectif et méthodologie

La plupart des espèces d'intérêt agricole et un nombre croissant d'espèces d'intérêt aquacole bénéficient des apports de programmes de sélection génétique visant l'amélioration de divers caractères d'intérêt dépendants des objectifs de production des filières concernées. Concernant l'ostréiculture, les objectifs des programmes de sélection visent principalement l'amélioration des caractères liés à la survie et à la croissance, à la résistance à des agents pathogènes et à des facteurs environnementaux défavorables mais aussi, selon Mahon (1983) à la morphométrie de l'animal, à la ponte et au développement larvaire.

En France, en plus de l'apport de la génétique consistant en la production d'huîtres triploïdes présentant des performances de croissance économiquement intéressantes, l'amélioration de la production de l'huître creuse *C. gigas* en France a fait l'objet d'un programme de recherche visant l'étude des bases génétiques de la mortalité estivale et des possibilités d'amélioration de la survie par sélection génétique (Samain et McCombie, 2008). Un programme de sélection divergente a été réalisé sur des familles présentant de faible ou de forte survies sur différents sites, bassin de Marenne-Oléron (Ronce-Les-Bains), Bretagne Sud (Rivière d'Auray) et Normandie (Baie des Veys), au cours de l'été 2001. Afin de tester la répétabilité de la réponse à la sélection observée en deuxième génération (en 2002) et de conserver les lignées consanguines, une troisième puis une quatrième génération ont été produites (Dégremont, *et al.*, 2010). L'étude des performances de survie de ces familles, qualifiées de « R » pour Résistantes et de « S » pour Sensibles, a permis de démontrer l'existence d'une base génétique de la survie des huîtres aux mortalités estivales qui, de surcroît, présente des héritabilités élevées (1.08 ± 0.46 à Ronce, 0.89 ± 0.40 à Rivière d'Auray et 0.47 ± 0.20 en Baie des Veys) (Dégremont, *et al.*, 2005; Dégremont, *et al.*, 2007; Samain et McCombie, 2008; Dégremont, *et al.*, 2010).

La caractérisation phénotypique des huîtres R et S a fait l'objet de nombreuses études (Samain et McCombie, 2008) mais une seule expérimentation portant sur la réponse de ces huîtres à une vibriose expérimentale a été menée (Gay, 2004): il a été montré, à l'occasion de cette unique infection expérimentale réalisée sur un faible nombre d'animaux, des différences significatives de sensibilité entre les familles composant la première génération (G1), laissant suspecter une base génétique pour la

réponse aux vibrioses. Cependant, les différentiels de survie observés chez ces familles après infection expérimentale par injection se révèlent être peu corrélés à ceux obtenus sur le terrain lors de mortalités estivales.

S'inscrivant dans le cadre de l'étude des facteurs de l'huître modulant sa sensibilité aux vibrioses, l'objectif de ce travail était d'explorer l'existence d'une base génétique de la réponse (résistance, sensibilité) des huîtres aux vibrioses expérimentales. Pour ce faire, les sensibilités à une infection expérimentale de quatorze familles de la cinquième génération (G5) produite en 2007 à l'écloserie de La Tremblade, ont été évaluées en utilisant le même protocole de co-injection de *V. splendidus* et *V. aestuarianus* (Saulnier, *et al.*, 2010). Ces familles de pleins frères et de demi-frères, transférées en Mars 2008 dans une claire située à proximité du laboratoire, ont bénéficié d'un suivi régulier et ont été testées à trois reprises au cours du mois d'Avril 2008.

Résultats et discussion

1. Bref historique des familles testées

Les croisements pour la production de la G5 ont été réalisés le 25 juin 2007 à l'écloserie de La Tremblade. Les familles ont été transférées pour la phase de grossissement en nurserie à Bouin le 3 septembre 2007. En novembre, un épisode de mortalité non documenté a affecté l'ensemble des familles R et S, induisant des taux de mortalité très variables selon les familles (de 100% pour les familles S11 et S12 à 0% pour la famille R5) dans la structure de nurserie de l'Ifremer de Bouin. Le 18 mars 2008, 1500 individus de chaque famille ont été rapatriés à La Tremblade et transférés dans une claire ostréicole à proximité du laboratoire.

Quatorze familles, 8 R (bleu) et 6 S (jaune), ont été choisies pour les expérimentations (Tableau 10), les animaux testés en infection expérimentale étaient des individus de 9 mois.

Tableau 10 : Les 14 familles de pleins frères et demi-frères de la G5 choisies pour l'étude de l'effet de la composante génétique sur la sensibilité des huîtres à une vibriose expérimentale. Les familles sont représentées selon le croisement dont elles sont issues, les géniteurs mâles et femelles utilisés apparaissant en ligne et en colonne. Ces familles consanguines R (bleu) et S (jaune) sont directement issues d'un programme de sélection divergente réalisé sur des familles présentant de faible ou de forte survies aux mortalités estivales.

♀/♂	1	4	5	8	9	12
1	R1	R2				
4	R3					
5			R5	R6		
8						
9					R9	R10
12						R12

♀/♂	1	4	5	8	9	12
1	S1	S2				
4	S3					
5			S5			
8				S8		
9						
12					S11	

2. Trois expérimentations de co-infection expérimentale par injection

Les expérimentations N°1 et N°2 (Tableau 11) ont été réalisées sur l'ensemble des 14 familles choisies, en avril 2008 avant la période de pleine maturité sexuelle. Au cours de l'expérimentation N°3, seules 4 familles, aux réponses contrastées en infection expérimentale, ont été testées : les familles R5, S8 présentant un profil « Résistant » aux vibrioses expérimentales et les familles S11 et R12 présentant un profil « Sensible » aux vibrioses expérimentales. Ces trois infections expérimentales ont été réalisées à 20°C selon le protocole mis au point pour l'étude des facteurs reproduction et ploïdie présentée précédemment (cf. chapitre 2, partie 1). Deux conditions ont été testées : une condition « témoin » constituée d'un lot d'animaux de chaque famille injecté d'eau de mer artificielle stérile (EMAS), une condition « infection expérimentale » constituée d'un lot d'animaux de chaque famille injecté d'un mélange de *V. splendidus* LGP32-GFP et *V. aestuarianus* à concentration égale, à la dose de 2.10^7 bactéries par individu.

Tableau 11 : Caractéristiques des infections expérimentales réalisées sur 14 familles de la G5.

Expérimentation	Date d'entrée en salle d'acclimation	Durée de l'acclimation (en jours)	Date de l'injection expérimentale	Dose utilisée (UFC/ind.)	Effectif témoin injecté EMAS par famille (nbre de bacs)	Effectif injecté <i>Vibrio</i> par famille (nbre de bacs)
N°1	10 avril	5	15 avril	2.10^7	30 (1)	90 (3)
N°2	15 avril	8	23 avril	2.10^7	30 (1)	90 (3)
N°3	29 avril	6	5 mai	2.10^7	40 (1)	70 (3)

3. Différentiels de survies entre les familles testées

A l'issue des trois périodes d'acclimation précédant les trois infections expérimentales, quelques individus morts issus de quelques familles ont été observés dans les bacs d'acclimation. Ces mortalités n'ont jamais excédé 15%. Dès la première infection expérimentale, des mortalités inattendues et variables selon les familles ont été observées sur les lots « Témoin » de chacune des familles au cours des trois infections expérimentales. De plus, des mortalités plus intenses, atteignant pour chacune des familles des taux de 100% à 6 jours post-injection, ont été observées sur les lots soumis à une co-injection de *Vibrio*. Ces taux de mortalité cumulés importants étaient inattendus car

supérieurs à ceux classiquement obtenus avec une dose infectieuse équivalente (Saulnier, *et al.*, 2010) et suggéraient une sensibilité plus importante de ces huîtres à cette vibriose expérimentale. Dans le but de documenter cette sensibilité accrue, des prélèvements d'hémolymphe ont été effectués sur quelques animaux moribonds, montrant une tonicité du muscle adducteur réduite (n=10), soumis à une injection d'eau de mer artificielle stérile, à plusieurs reprises au cours des expérimentations N°2 et N°3. L'analyse de ces échantillons individuels par étalement sur milieu Marine Agar révèle des profils bactériens monomorphes chez la totalité des individus analysés, atteignant des charges supérieures à 10^6 UFC/mL d'hémolymphe. Un test de diagnostic par PCR classique sur colonie a permis l'identification de *V. aestuarianus* chez tous les individus testés. Une infection à *V. aestuarianus* de type « septicémique » a donc été mise en évidence chez ces animaux soumis à la condition témoin.

NB : Le terme septicémie peut apparaître impropre dans la mesure où 1. l'hémolymphe des huîtres n'est pas un tissu stérile et 2. les *Vibrio* sont détectés dans tous les organes des huîtres lors d'infection aiguë.

Compte tenu de l'intensité des mortalités expérimentales obtenues, l'étude des réponses de ces huîtres à une vibriose expérimentale s'est portée sur l'analyse des taux de survie obtenus à deux jours post-injection. La variabilité inter-bac étant négligeable, l'ensemble des survies moyennes observées à J2 (en %), pour chacune des familles soumises aux deux conditions « Témoin » (EMAS) et « Infection expérimentale » (*Vibrio*) est représenté dans le Tableau 12. Un classement des sensibilités observées y apparaît : les 7 meilleurs taux de survie obtenus pour chaque condition des deux premières expérimentations sont représentés en vert, les 7 plus faibles taux de survie sont représentés en orange.

Tableau 12 : Taux de survie obtenus deux jours après l'injection d'eau de mer artificielle stérile (témoin) ou de *V. splendidus* et *V. aestuarianus* pour chacune des 14 familles testées à trois reprises au cours du mois d'avril 2008 (Expérimentations N°1, N°2 et N°3) : en vert, les 7 meilleurs taux de survie obtenus pour chaque condition des deux premières expérimentations et en orange, les 7 plus faibles taux de survie. Nt : non testée. Les familles sont classées par ordre de moyennes de survies décroissantes, calculées aux quatre conditions N°1 Témoin, N°1 *Vibrio*, N°2 Témoin, N°2 *Vibrio*.

Conditions/ Familles	N°1 Témoin	N°1 <i>Vibrio</i>	N°2 Témoin	N°2 <i>Vibrio</i>	N°3 Témoin	N°3 <i>Vibrio</i>
R2	100	84	92	57	nt	nt
R5	94	90	93	43	100	85
R6	97	79	78	32	nt	nt
S8	88	72	87	24	98	79
R3	81	86	76	19	nt	nt
R1	100	79	66	14	nt	nt
R10	80	64	72	27	nt	nt
S5	77	49	82	13	nt	nt
S2	97	54	49	4	nt	nt
S1	94	61	27	7	nt	nt
R9	74	53	29	4	nt	nt
S3	73	50	31	4	nt	nt
R12	69	53	20	13	95	72
S11	68	47	36	3	85	81

Malgré les événements de mortalité non désirés et la sensibilité accrue de ces animaux soumis à une dose infectieuse supérieure à une DL50 dans ces conditions, cette représentation des résultats de survie met en évidence différents points intéressants :

- une grande variabilité de sensibilité entre les familles testées : les taux de survie peuvent varier du simple au double selon les familles considérées ;
- une conservation des rangs de sensibilité au niveau familial dans au moins 3 conditions sur 4 (N°1 Témoin, N°1 *Vibrio*, N°2 Témoin, N°2 *Vibrio*) : 8 familles sur les 14 testées conservent leur rang aux quatre conditions (R2, R5, R6, R9, R12, S3, S8 et S11) ;
- le groupe des 7 meilleurs taux de survie représentés en vert est principalement composé des taux de survie observés chez les familles R (21/32 taux de survie analysés) ; le groupe des 7 plus faibles taux de survie représentés en orange est principalement composé des taux de survie observés chez les familles S (17/24 taux de survie analysés) ;

- trois familles au profil atypique : les familles R9 et R12 présentent quelles que soient les conditions un profil de type « Sensible », à l'inverse, la famille S8 présente quelles que soient les conditions un profil de type « Résistant ».

Ainsi, le tableau ci-dessous (Tableau 13) rend compte des comportements contrastés en terme de sensibilité aux vibrioses expérimentales des familles testées. Cependant, au vu des survies obtenues suite aux vibrioses expérimentales, deux familles (R9 et R12) sur les huit familles « R » testées présentent de faibles taux de survie et une famille (S8) sur les 6 familles « S » testées présente de forts taux de survie à une vibriose expérimentale. Les familles « bleues » présentent un profil « Résistant », et les « jaunes », un profil « Sensible » à une vibriose expérimentale.

Tableau 13 : Les 14 familles de pleins frères et demi-frères de la G5 testées en infection expérimentale. Les couleurs reflètent leur profil de sensibilité à une vibriose expérimentale : le bleu, le profil « Résistant » et le jaune, le profil « Sensible ».

♀/♂	1	4	5	8	9	12
1	R1	R2				
4	R3					
5			R5	R6		
8						
9					R9	R10
12						R12

♀/♂	1	4	5	8	9	12
1	S1	S2				
4	S3					
5			S5			
8				S8		
9						
12					S11	

4. Analyse des différentiels de survies entre familles testées par une approche de type ANOVA

NB : Cette analyse statistique mérite d'être approfondie et affinée ; elle apporte cependant un éclairage intéressant sur ces résultats. Une analyse similaire à celle empruntée dans l'Article 3 pourrait être envisagée et permettrait de prendre en compte l'intégralité des cinétiques d'infection.

Ainsi, dans le but d'approfondir ces premières observations contrastées, des analyses de type ANOVA ont été réalisées sur ces données de survie obtenues à 2 jours post-injection (EMAS ou *Vibrio*). Plusieurs arguments ont contribué à cette démarche :

- l'observation d'un différentiel important d'intensité des mortalités entre les conditions « témoin » (EMAS) et les conditions « infection expérimentale » (*Vibrio*) avec des mortalités systématiquement plus intenses après injection de *Vibrio*,
- l'observation d'un différentiel important d'intensité des mortalités entre les 14 familles testées,
- l'observation d'une conservation des rangs de sensibilité au niveau familial quelles que soient les conditions prêtant une certaine cohérence biologique aux événements étudiés,
- les diagnostics d'hémolymphes « septicémiques » à *V. aestuarianus* observés chez les animaux « témoin » moribonds menant à considérer l'injection des *Vibrio* comme une infection de seconde intention, la première, non contrôlée, ayant été probablement exacerbée par le stress de transfert et la piqûre d'eau de mer artificielle stérile.

Quatre ANOVA, relatives aux quatre étapes de la démarche, ont été réalisées (XLSTAT) sur les données de survie normalisées (transformation normalisatrice de type $\arcsin\sqrt{\text{survie}[0-1]}$) observées deux jours post-injection par bac. Les différentes variables explicatives considérées sont les trois infections expérimentales, les conditions (« Témoin » par injection d'EMAS ou « Infection expérimentale » par injection de *Vibrio*), les 14 familles testées, les profils R et S initiaux.

Première étape : interaction entre « Infection expérimentale » et « Famille »

La première étape consistait à vérifier statistiquement que chaque famille se comportait de la même façon à chaque infection expérimentale, autrement dit que le « rang de sensibilité » de chaque famille était conservé sur l'ensemble des expérimentations. Cela revenait à rechercher d'éventuelles interactions entre « Infection expérimentale » et « Famille ».

Résultats d'analyse du modèle 1 :

Survies = Famille + Infection expérimentale + Famille x Infection expérimentale

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	31	6.697	0.216	6.836	< 0.0001
Résidus	96	3.034	0.032		
Total	127	9.731			

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Famille	13	1.899	0.146	4.622	< 0.0001
Infection expérimentale	2	4.497	2.248	71.149	< 0.0001
Famille*Infection expérimentale	17	0.302	0.018	0.562	0.912

→ Aucune interaction entre « Infections expérimentales » et « Famille » n'étant observée sur les survies analysées ($p=0.912$), les familles se comportent donc de la même façon à chaque expérimentation d'infection expérimentale. On peut donc se permettre de travailler toutes expérimentations confondues.

Deuxième étape : effet de l'injection de *Vibrio* par comparaison à l'injection d'EMAS

La deuxième étape consistait à vérifier l'effet « injection de *Vibrio* » (seconde infection) par comparaison des survies obtenues aux deux conditions, « Témoin » ou « *Vibrio* ». Cela revenait à rechercher statistiquement un effet « nature de l'élément injecté » par une ANOVA à un seul facteur réalisée sur l'ensemble du jeu de données.

Résultats d'analyse du modèle 2 :

Survies = Condition EMAS ou *Vibrio*

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	1	2.475	2.475	42.975	< 0.0001
Résidus	126	7.256	0.058		
Total	127	9.731			

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
EMAS ou <i>Vibrio</i>	1	2.475	2.475	42.975	< 0.0001

→ On observe un effet significatif du type d'injection (EMAS ou *Vibrio*) ($p<0.0001$) confirmant l'effet de l'injection de *Vibrio* sur les survies obtenues à J2. En effet, l'injection expérimentale de *Vibrio* réduit significativement les survies par comparaison à celles obtenues après injection d'EMAS lors des trois infections expérimentales réalisées.

Troisième étape : effet de la sélection sur les survies obtenues après infection expérimentale

Le caractère « conservé » du rang de sensibilité étant confirmé, les animaux ayant bien été affectés par les injections de *Vibrio* et d'eau de mer artificielle, on peut donc chercher un effet « Sélection » sur les survies obtenues, en comparant les familles R et les familles S (toutes confondues dans un premier temps même si on distingue des profils atypiques chez les unes et les autres).

Résultats d'analyse du modèle 3 :

Survies = Profil R ou S + Condition EMAS ou *Vibrio* + Profil R ou S x Condition EMAS ou *Vibrio*

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	3	2.793	0.931	16.638	< 0.0001
Résidus	124	6.938	0.056		
Total	127	9.731			

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Résistance ou Sensible	1	0.300	0.300	5.369	0.022
EMAS ou <i>Vibrio</i>	1	2.490	2.490	44.504	< 0.0001
Résistance ou Sensible*EMAS ou <i>Vibrio</i>	1	0.002	0.002	0.039	0.844

→ Quelles que soient les conditions expérimentales (injections EMAS ou *Vibrio*), un effet « Sélection » ($p=0.022$) sur les survies analysées est mis en évidence. On peut donc conclure à un effet de la sélection sur la sensibilité des familles à une vibriose expérimentale.

Quatrième étape = recherche d'un effet « Famille » sur les survies obtenues après infection expérimentale

Afin d'affiner cette dernière observation, il était intéressant de tester l'effet « Famille » puisque des comportements familiaux atypiques ont été notés en intra-R (R9 et R12) et intra-S (S8).

Résultats d'analyse du modèle 4 :

Survies = Famille + Condition EMAS ou *Vibrio* + Famille x Condition EMAS ou *Vibrio*

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	27	4.543	0.168	3.243	< 0.0001
Résidus	100	5.188	0.052		
Total	127	9.731			

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Famille	13	1.899	0.146	2.815	0.002
EMAS ou <i>Vibrio</i>	1	2.313	2.313	44.589	< 0.0001
Famille*EMA ou <i>Vibrio</i>	13	0.331	0.025	0.491	0.925

→ Quelles que soient les conditions expérimentales (injections EMAS ou *Vibrio*), un effet « Famille » ($p=0.002$) est mis en évidence sur les survies analysées.

5. Analyses complémentaires : co-détections de *V. aestuarianus* et de l'herpès virus OsHV-1

Afin de documenter les mortalités anormales dans la condition « Témoin », *V. aestuarianus* et l'herpès virus OsHV-1 ont été recherchés et quantifiés par PCR en temps réel diagnostiques dans des broyats totaux des tissus d'individus (famille S11, $n=20$) moribonds injectés d'eau de mer artificielle stérile prélevés au cours des trois expérimentations (Pépin, *et al.*, 2008). De plus, 5 individus prélevés au moment du transfert des animaux en salle d'infection expérimentale (T0) ont été analysés de la même façon.

Des cas de co-détections *V. aestuarianus* et OsHV-1 ont été mis en évidence : 21 individus sur 25 analysés se sont avérés porteurs des deux agents pathogènes recherchés et ce, dès le T0 et au cours des 3 infections expérimentales. Les charges de *V. aestuarianus* étaient comprises entre $2.1 \cdot 10^2$ et $6.2 \cdot 10^6$ équivalent génomes bactériens par gramme de tissu broyé ; les charges de OsHV-1 étaient comprises entre $8.3 \cdot 10^5$ et $1.1 \cdot 10^9$ copies virales par gramme de tissu broyé.

Par ailleurs, à différents temps de l'infection expérimentale N°1 (T0, T24h, T48h, T72h, T96h), *V. aestuarianus* et l'herpès virus OsHV-1 ont été recherchés et quantifiés par PCR en temps réel chez des individus soumis à la condition témoin (injection d'eau de mer artificielle). Les analyses, réalisées sur des broyats totaux des tissus d'individus de la famille S11 vivants (T0) ou moribonds (T24h, T48h, T72h, T96h), révèlent à nouveau des co-détections systématiques de ces deux agents infectieux chez la totalité des animaux moribonds ayant subi une injection d'EMAS (Figure 44). Malgré une grande variabilité individuelle, on note une augmentation des charges moyennes en *V. aestuarianus* au cours du temps : à 24h post-injection, la charge moyenne atteint $3 \cdot 10^3$ bact./g, à 48h, elle est de $7.6 \cdot 10^5$ bact./g, à 72h, de $2.1 \cdot 10^6$ bact./g et enfin à 96h post-injection, elle est de $1.2 \cdot 10^6$ bact./g. Les charges estimées d'herpès virus, quant à elle, apparaissent relativement stables au cours du temps et peu variables au niveau individuel. Ce type d'étude mériterait d'être à nouveau mené sur un plus grand nombre d'individus analysés et des lots d'animaux d'origine diverse. Cela permettrait de

décrire la dynamique des co-infections naturelles à *Vibrio* pathogènes et OsHV-1, ainsi que les différents scénari possibles en fonction des facteurs environnements (température notamment) et de l'état physiologique de l'hôte (âge, génétique, effort reproducteur).

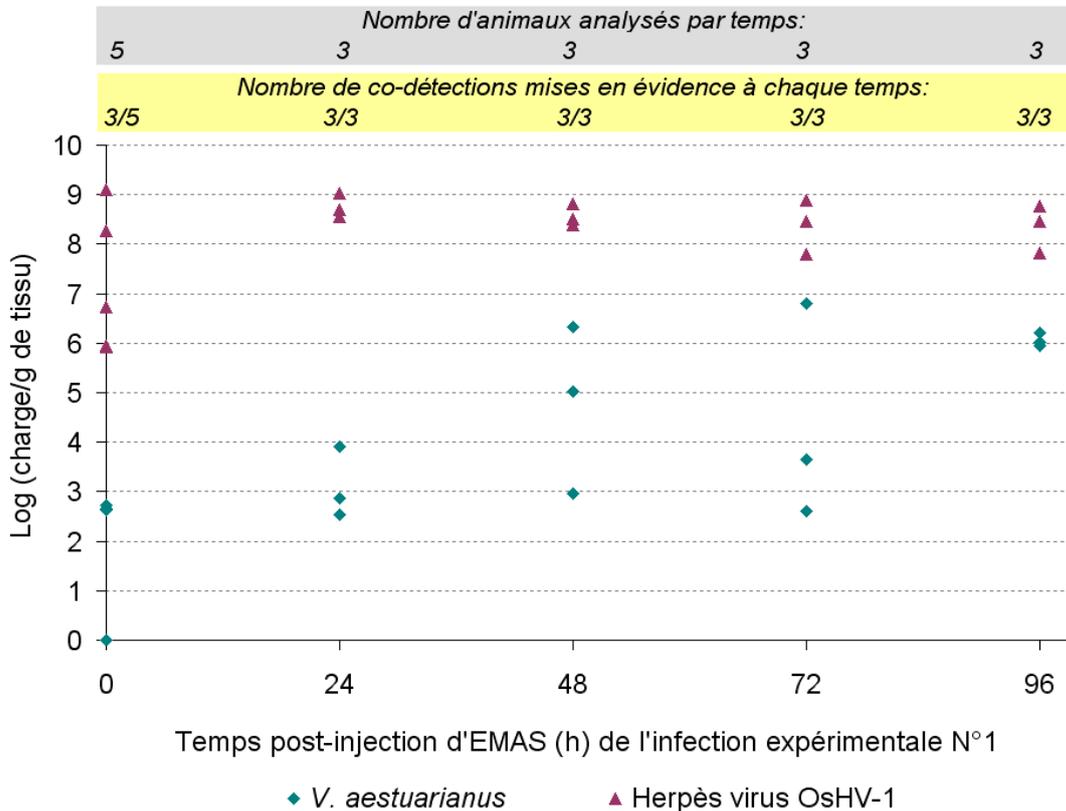


Figure 44 : Quantification de *V. aestuarianus* et OsHV-1 chez des individus témoins prélevés au cours de l'infection expérimentale N°1.

Enfin, des recherches de *V. aestuarianus* ont été réalisées par PCR en temps réel entre le 16 mai et le 13 juin dans différents types d'échantillons environnementaux : ces résultats apparaissent dans l'article 2 (Saulnier, *et al.*, 2009). *V. aestuarianus* a été détecté dans la totalité des prélèvements effectués en différents points de la station de La Tremblade au cours de cette période : dans l'eau de la claire (le 16 mai), dans différents échantillons d'algues utilisées pour le nourrissage des animaux pendant les périodes d'acclimatation, dans l'eau d'entrée de l'écloserie ainsi que dans des bassins extérieurs. Les quantifications de *V. aestuarianus* dans ces différents échantillons environnementaux étaient comprises entre 25 et 400 cellules bactériennes par millilitre d'échantillon prélevé.

6. Episode de mortalité dans la claire ostréicole : co-détection de *V. aestuarianus* et de l'herpès virus OsHV-1

Suite à ces expérimentations, des mortalités massives ont touché l'ensemble des familles stockées dans des poches ostréicoles, dans la claire située à proximité de l'Ifremer (100m environ). Cet épisode a débuté entre le 30 avril et le 05 mai 2008, dates auxquelles quelques individus morts avaient été observés dans les poches. Les courbes de températures enregistrées dans la claire montrent une augmentation brutale des températures de 16°C à 25°C entre le 30 avril et le 3 mai. La Figure 45 représente les taux de mortalité observés pour chacune des familles le 15 mai 2008. Il est intéressant de noter à nouveau la conservation des mêmes rangs de sensibilité que ceux obtenus après vibrioses expérimentales, ainsi que l'observation des trois familles au profil atypique précédemment mises en évidence, à savoir les familles S8, R9 et R12. De plus, le différentiel de survies entre famille apparaît à nouveau très contrasté, les taux de mortalité compris entre 15% (R6) et 66% (S1).

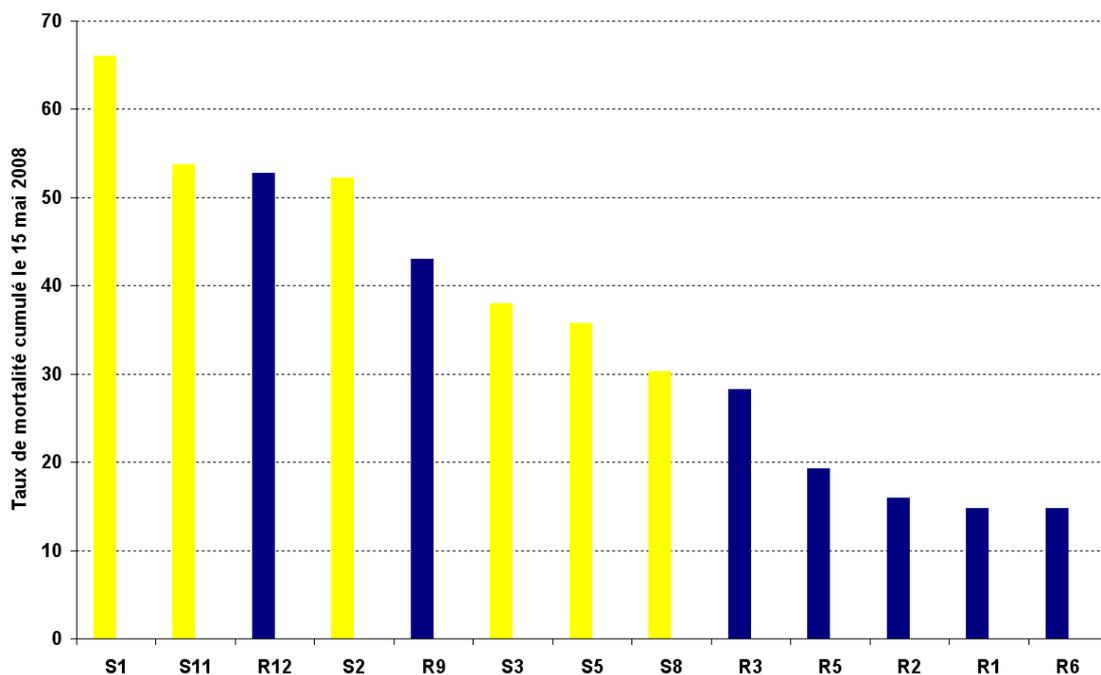


Figure 45 : Taux de mortalité (%) observés le 15 mai 2008 pour chacune des 14 familles stockées dans la claire ostréicole.

De la même façon que précédemment et afin de réaliser un suivi des agents pathogènes suspects, *V. aestuarianus* et OsHV-1, dans la claire ostréicole, dix individus issus des familles aux profils contrastés R5 et S11, ont été prélevés vivants dans les poches stockées dans la claire à trois temps :

T0, le 20 mars 2008 : arrivée des familles à La Tremblade,

T1, le 12 mai 2008 : au cours de l'épisode de mortalité décrit ci-dessus,

T2, le 05 juin 2008 : deux semaines après l'épisode de mortalité.

V. aestuarianus et l'herpès virus OsHV-1 ont été recherchés et quantifiés par PCR en temps réel dans les broyats totaux des tissus de ces individus.

Les résultats ne révèlent aucun différentiel de portage ou de prévalence entre les familles R5 et S11 pour aucun des deux agents infectieux recherchés. Les résultats de ces diagnostics (les deux familles confondues) sont représentés dans le Tableau 14 : une prévalence variable dans le temps est observée concernant les deux agents infectieux. Quelques individus vivants étaient porteurs aux trois temps analysés de *V. aestuarianus* et du virus OsHV-1. Six cas de co-détections de ces deux agents pathogènes sont mis en évidence : un maximum de co-détections (4/20 individus) est observé au T2, au cours de l'épisode de mortalité.

Tableau 14 : Détection et quantification de *V. aestuarianus* et OsHV-1 par PCR quantitative dans des broyats totaux de tissus d'individus vivants prélevés dans la claire ostréicole à trois temps encadrant l'épisode de mortalité décrit ci-dessus.

	T0 : 20 mars 2008		T1 : 12 mai 2008	T2 : 5 juin 2008
Prévalence <i>V. aestuarianus</i>	5/20 ind.	Episode de mortalité ayant débuté entre le 30 avril et le 5 mai	6/20 ind.	5/20 ind.
Charges (bact./g de tissu)	3,5.10 ²		1,5.10 ²	8,4.10 ²
Prévalence OsHV-1	2/20 ind.		9/20 ind.	4/20 ind.
Charges (nbre de copies/g de tissu)	2,5.10 ⁴		5,9.10 ⁶	6,6.10 ⁴
Cas de co-détections	1 ind.		4 ind.	1 ind.

La description de ces cas de co-détections au niveau individuel de ces deux agents infectieux, *V. aestuarianus* et herpès virus OsHV-1 associés à un épisode de mortalité, nous a conduits à qualifier de façon systématique les lots d'huîtres destinées aux expérimentations futures. Au cours de cette période, un lot d'huîtres diploïdes de 18 mois, issu de recrutements naturels du Bassin de Marennes Oléron et destiné à constituer un témoin d'expérimentation, a été transféré dans les infrastructures terrestres de l'Ifremer. Ce lot d'huîtres a subi au cours de ce mois de juin des mortalités importantes (>90% de mortalité en quelques jours) qui ont pu être précisément documentées du fait de sa proximité

avec le laboratoire. Alors qu'aucune détection d'herpès virus OsHV-1 n'a été mise en évidence sur ce lot, les résultats des analyses diagnostiques ont révélé un portage asymptomatique faible en *V. aestuarianus* des animaux à leur arrivée sur le site de l'Ifremer : un individu sur les 15 analysés était porteur de *V. aestuarianus* dont la charge atteignait $8.3 \cdot 10^4$ bact./g de tissu. L'analyse des broyats de tissus totaux prélevés d'animaux vivants ou moribonds au cours de l'épisode de mortalité affectant ce lot a permis de mettre en évidence chez la totalité des individus analysés des portages en *V. aestuarianus* atteignant des valeurs supérieures à 10^5 bact./g chez les animaux vivants et supérieures à 10^8 bact./g chez les animaux moribonds. L'herpès virus OsHV-1 n'a été détecté à aucun moment ni dans aucun échantillon analysé issus de ce lot d'huîtres.

Par ailleurs, quelques études rapportent des cas de co-infections virus-*Vibrio* chez des poissons ou crustacés d'élevage et l'existence d'effets synergiques d'une double infection expérimentale virus-*Vibrio* sur la mortalité des individus hôtes (Lee, *et al.*, 1999; Pakingking, *et al.*, 2003; Selvin et Lipton, 2003; Oh, *et al.*, 2006; Phuoc, *et al.*, 2008; Phuoc, *et al.*, 2009). L'ensemble de ces observations incite vivement à l'exploration de ces co-infections herpès-*Vibrio* et de la nature des interactions reliant ces deux types d'agents infectieux.

Ainsi, au cours du printemps 2008, les analyses diagnostiques documentant l'ensemble des épisodes de mortalité affectant les différents lots d'huîtres étudiés révèlent 1. des cas de vibrioses naturelles à *V. aestuarianus* exacerbées par différents types de stress (transfert, injection EMAS) mais également 2. des cas d'association concomittante des deux agents pathogènes recherchés, *V. aestuarianus* et herpès virus OsHV-1. La variabilité de ces scénari diagnostiques souligne des étiologies infectieuses diverses selon les épisodes de mortalité considérés, et en tout état de cause suggère également une plus grande sensibilité des huîtres à des agents infectieux de nature très différente.

Conclusion et perspectives

Malgré les événements de mortalité non attendus affectant les lots témoins et pour lesquels *V. aestuarianus* et l'herpès virus OsHV-1 ont été détectés, l'analyse des survies obtenues deux jours post-injection au cours des trois expérimentations suggère une base génétique de la variabilité des capacités de résistance des huîtres à une vibriose expérimentale : les 14 familles testées présentent le même type de réponse quelle que soit la condition d'injection, eau de mer artificielle stérile ou *Vibrio*. De plus, l'analyse statistique met en évidence une différence significative des sensibilités à une vibriose expérimentale entre les familles issues de la sélection divergente. Ainsi, l'existence de profils contrastés au sein de ces familles ouvre des perspectives intéressantes au sujet de la faisabilité d'un programme d'amélioration génétique des performances de survie des huîtres creuses soumises à une infection de type vibriose. Afin de démontrer l'existence de cette base génétique, il conviendrait de réaliser un programme visant la sélection du caractère « résistance à une vibriose expérimentale », d'évaluer l'héritabilité de ce caractère et de tester les performances de ces animaux sélectionnés *in situ*. Le protocole d'infection expérimentale pourrait alors être utilisé comme outil de sélection d'animaux résistants à une vibriose, la dose utilisée devant être adaptée pour l'obtention d'animaux survivants. La commodité de préparation des inocula bactériens apparaît comme un atout technique non négligeable pour ce type d'étude. Enfin, la caractérisation génétique de ce différentiel de résistance entre familles pourrait permettre l'identification de gènes impliqués dans la réponse à une vibriose et la définition de marqueurs génétiques de meilleure performance de survie. De plus, ces familles consanguines aux réponses contrastées pourraient constituer un matériel de choix pour des expérimentations futures dans des objectifs de pathogénèse.

De plus, la dose infectieuse à laquelle ont été soumises ces familles a induit des mortalités expérimentales dépassant largement les taux classiquement obtenus par cette DL50. La sensibilité de ces animaux à cette dose peut s'expliquer par l'existence de porteurs asymptomatiques à *V. aestuarianus* et à l'herpès virus OsHV-1 avant transfert en salle d'infection expérimentale. Ainsi, la détection précoce d'agents pathogènes connus chez des individus ne présentant *a priori* aucun symptôme de fragilité semble être un critère pertinent prédictif d'une sensibilité accrue de ces animaux à un quelconque stress (manipulation, transfert, choc thermique). L'effet de certains stress dans le déclenchement de mortalité chez des animaux porteurs asymptomatiques ou sains mérite également d'être étudié : l'induction d'un stress en conditions standardisées permettrait de mettre en évidence des portages asymptomatiques non détectables (< seuil de sensibilité) par les méthodes de diagnostic utilisées.

Enfin, deux agents pathogènes, *V. aestuarianus* et l'herpès virus OsHV-1 ont été détectés associés à l'ensemble des épisodes de mortalité affectant les familles étudiées, en condition expérimentale ou dans la culture ostréicole. De nombreux cas de co-détections ont été mis en évidence dans des échantillons individuels. La nature de la relation entre ces deux agents pathogènes et leur implication dans le déclenchement des mortalités et leur intensité devraient être explorées avec précision. Des expérimentations de co-infections expérimentales couplées à des analyses diagnostiques, des quantifications des agents pathogènes dans différents tissus permettraient d'établir des cinétiques de co-infections et renseigneraient sur la nature des interactions les reliant.

CHAPITRE 3

INTERACTIONS *VIBRIO*-HUITRE :

ÉTUDE DE LA PATHOGENESE

PAR COHABITATION EXPERIMENTALE.

Sommaire du Chapitre 3

1	Introduction et résultats préliminaires	251
2	Article 4 : Evidence of an immediate but short term response of <i>Crassostrea gigas</i> oyster induced by virulent or avirulent <i>Vibrio</i> bacteria.	259

1 Introduction et résultats préliminaires

Dans le but d'explorer la dynamique d'interactions liant les bactéries du genre *Vibrio* et l'huître creuse *C. gigas*, un protocole d'infection expérimentale non invasive a été mis au point. Au cours de cette infection expérimentale, les analyses descriptives ont porté sur le suivi qualitatif et quantitatif 1. de la flore vibrionacée totale dans l'hémolymphe et dans l'eau des bacs, 2. des deux agents pathogènes utilisés *V. splendidus* LGP32 et *V. aestuarianus* 02/041 dans l'hémolymphe et dans l'eau des bacs et enfin, 3. des niveaux de transcrits de différents gènes hématocytaires potentiellement impliqués dans les mécanismes de défense de l'huître creuse. Le choix de ces différents descripteurs de pathogénèse, pour lesquels des outils de PCR en temps réel ont été spécialement mis au point, a été motivé par plusieurs travaux relatés dans la littérature mais également par quelques observations faites au cours de cette thèse. L'ensemble de ces points apparaît ci-dessous.

Les huîtres et la flore bactérienne résidente

De par son activité de filtration et son système circulatoire semi-ouvert, l'huître est naturellement peuplée d'une microflore bactérienne riche, à la surface comme à l'intérieur des organes et tissus comme l'hémolymphe, et constitue de fait, une niche propice aux interactions entre divers microorganismes (Colwell et Liston, 1960a; Prieur, *et al.*, 1990; Olafsen, *et al.*, 1993; Pruzzo, *et al.*, 2005). Cette microflore bactérienne peut être utilisée comme ressources trophiques ou bien participer aux activités digestives, et pourrait également avoir un rôle de probiotique, par exclusion compétitive, par la production de composés antimicrobiens, ou par stimulation du système immunitaire (Austin, *et al.*, 1995; Millikan et Ruby, 2002; Thompson, *et al.*, 2006).

Par ailleurs, l'huître constitue également une véritable niche écologique de divers microorganismes pathogènes pour l'homme, caractéristique qui lui vaut de nombreux travaux visant l'étude de ces associations, leurs variations saisonnières et l'optimisation de protocoles de « dépuración » visant à abaisser le nombre de bactéries indésirables afin de rendre l'huître consommable (Vasconcelos et Lee, 1972; Son et Fleet, 1980; Kelly et Stroh, 1988; Chan et Ho, 1993; DePaola, *et al.*, 2003). Cependant, les protocoles de dépuración réalisés, tel l'usage d'eau traitée aux rayons UV chez différents bivalves, ont montré des efficacités variables mais ont abouti à la mise en évidence de différentiels de persistance en fonction de l'espèce bactérienne suivie, présageant de phénomènes spécifiques d'interactions hôte-bactérie (Perkins, *et al.*, 1980; Richards, 1988; Prieur, *et*

al., 1990; Olafsen, *et al.*, 1993; Harris-Young, *et al.*, 1995; Croci, *et al.*, 2002; de Abreu Corrêa, *et al.*, 2007).

Ainsi, cette cohabitation entre l'huître et les bactéries résidentes peut s'expliquer par le fait que l'hôte doit posséder un système immunitaire suffisamment discriminant et efficace pour maintenir un équilibre en faveur des bactéries commensales et au détriment des bactéries pathogènes. Cependant, il n'existe aucune étude portant sur la composition spécifique, qualitative et quantitative, des communautés bactériennes associées à l'huître *C. gigas*, sur la variabilité des structures de ces populations sous l'effet de différents paramètres environnementaux ou pathogéniques, ou encore sur l'implication de ce microbionte dans les mécanismes de défense de l'animal. De plus, à ce jour aucune étude n'a exploré le rôle de la flore microbienne associée à l'huître, et plus particulièrement à l'hémolymphe, dans le maintien des équilibres, dans les mécanismes de défense de l'animal, et notamment dans le contrôle d'éventuels agents pathogènes.

L'ensemble de ces observations nous ont conduits à mener deux types d'études exploratoires :

1. Une première étude préliminaire visait la caractérisation de la flore bactérienne présente dans l'hémolymphe d'un lot d'huîtres creuses par une approche de type métagénomique. Si ce travail, dont les premiers résultats sont mentionnés dans le chapitre 1, a permis l'identification d'isolats bactériens appartenant aux genres *Pseudoalteromonas*, *Vibrio*, *Colwellia*, à la famille des Flavobactéries et au groupe des Roseobacter, il doit être réitéré et approfondi.
2. Une deuxième étude visait l'exploration du rôle de la flore bactérienne de l'huître sur sa sensibilité à une vibriose expérimentale. Pour ce faire, des protocoles de dépuración bactérienne ont été réalisés afin de réduire la flore hétérotrophe normale de l'hémolymphe de l'huître par stabulation en eau décantée, filtrée et traitée aux rayons UV. Des quantifications de la flore présente dans l'hémolymphe, avant ou après 7 jours de stabulation dans ces conditions, ont été réalisées par étalement de prélèvements individuels d'hémolymphe sur milieu Marine Agar. Ce protocole a permis d'une part, de mettre en évidence l'existence d'une flore variable d'un point de vue quantitatif, fluctuant selon la saison et comprise entre 2.10^2 et $8,5.10^3$ UFC/mL en février et entre 8.10^2 à $4,2.10^4$ UFC/mL en mai. D'autre part, les essais de dépuración des huîtres ont permis une diminution quantitative de la flore bactérienne de l'hémolymphe d'un facteur 10. Enfin, l'influence de la flore bactérienne de l'huître sur sa sensibilité à une vibriose expérimentale a été testée selon deux approches. La première a été réalisée en infection expérimentale par injection de

V. splendidus LGP32 ($5 \cdot 10^7$ UFC/ind.) chez des huîtres ayant été soumises à ce protocole de dépuración et chez des huîtres témoins non dépurées : le décalage dans le temps des pics de mortalité observés chez les deux différents lots d'huîtres suggère qu'une diminution de la flore endogène de l'hémolymphe de l'huître se traduit par une sensibilité accrue de cette dernière à une injection expérimentale de *V. splendidus* (Figure 46).

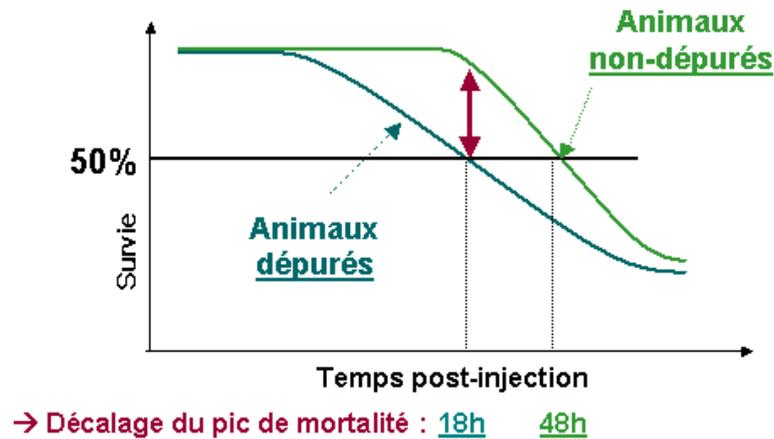


Figure 46 : Schéma des courbes de survies obtenues après injection de *V. splendidus* chez des huîtres ayant été soumises à un protocole de dépuración bactérienne (courbe bleu) et chez des huîtres non dépurées (courbe verte).

La deuxième approche consistait en une infection expérimentale par baignade à 20°C de ces animaux dépurés ou non : ces lots d'huîtres (2 aquariums de 20 individus par condition) ont été immergés dans de l'eau de mer contaminée en *V. splendidus* LGP32 et *V. aestuarianus* 02/041 ($2 \cdot 10^6$ UFC/mL d'eau de mer). Sept jours après le début de la baignade, les survies enregistrées chez les huîtres dépurées étaient de 10% et de 15% dans les deux aquariums alors qu'aucune mortalité n'a été observée chez les huîtres n'ayant pas été soumises au protocole de dépuración.

Compte tenu de la variabilité observée de l'efficacité de ce protocole de dépuración bactérienne en fonction de la saison et de la provenance des lots d'huîtres testés, ces expérimentations n'ont pu être reproduites dans des conditions similaires. Ces résultats préliminaires montrent cependant clairement l'influence de la flore bactérienne de l'hémolymphe sur la sensibilité de ces huîtres. Par ailleurs, ils incitent nettement la poursuite des investigations portant sur la nature de cette flore bactérienne hémolympatique et son rôle dans l'équilibre de l'hôte. Enfin, le protocole de dépuración testé ne permet pas l'élimination totale ou quasi-totale de la flore bactérienne résidente mais seulement une réduction d'un facteur 10 de sa charge et ce malgré un traitement aux UV prolongé de l'eau des bacs : il permet néanmoins de disposer d'animaux présentant des niveaux

« normalisés » de portage bactérien tendant vers une « standardisation » des animaux d'expérimentations facilitant l'étude des interactions huîtres-*Vibrio*. Ce phénomène est relaté dans la littérature chez différentes espèces de bivalves (Hardy, *et al.*, 1977; Perkins, *et al.*, 1980; Richards, 1988; Prieur, *et al.*, 1990; Murphree et Tamplin, 1995), suggérant l'existence d'une communauté bactérienne persistante quelque soit la qualité bactériologique de l'eau environnante. Plus précisément, ces travaux ont montré que des bactéries du genre *Vibrio* présentaient des capacités de persistance supérieures à celles d'autres espèces ou genres bactériens comme *E. coli* ou *Salmonella* sp. Ainsi, l'ensemble de ces résultats nous ont conduits à nous focaliser sur le suivi de la flore vibrionacée totale de l'hémolymphe de l'huître creuse au cours d'une infection expérimentale par cohabitation dont les résultats sont présentés dans l'article 4.

Hémocytes et *Vibrio*

L'écosystème marin regorge de bactéries appartenant au genre *Vibrio*, qui occupent une large gamme de niches écologiques et sont présentes dans la quasi-totalité des biotopes marins (Maeda, *et al.*, 2003; Thompson, *et al.*, 2004b; Thompson, *et al.*, 2005; Eiler, *et al.*, 2006; Reen, *et al.*, 2006; Thompson, *et al.*, 2006; Nogales, *et al.*, 2007; Turner, *et al.*, 2009). Présents à l'état libre ou planctoniques, ou associées à des surfaces biotique ou abiotique, les vibrions peuvent être également symbiontes, commensaux ou pathogènes de nombreux organismes aquatiques.

Le genre *Vibrio* est le genre cultivable majoritaire de la microflore normale de l'huître creuse même si les genres *Achromobacter*, *Flavobacterium* et *Pseudomonas* sont également représentés (Colwell et Liston, 1960b; Prieur, 1981b; 1981a; Prieur, *et al.*, 1990). Certaines espèces ont notamment été isolées de l'hémolymphe d'huître creuses *Crassostrea gigas* telles que *V. gigantis* (Le Roux, *et al.*, 2005) et *V. crassostreae* (Faury, *et al.*, 2004) et se sont révélées virulentes chez *C. gigas* en infection expérimentale. La plupart des vibrions sont des bactéries commensales de nombreux hôtes marins (Weiner, *et al.*, 1985; Olafsen, *et al.*, 1993; Ortigosa, *et al.*, 1994; Pujalte, *et al.*, 1999; Macián, *et al.*, 2000; Guisande, *et al.*, 2004; Guisande, *et al.*, 2008) et même symbiontes (association *V. fisheri* et calmar *Euprymna scolopes*) (Ruby, 1996; McFall-Ngai, 2000). Certains de ces vibrions sont des pathogènes d'animaux marins tels que *V. splendidus* (Austin et Austin, 2007), ou *V. tapetis* responsable de la maladie de l'anneau brun chez la palourde (Borrego, *et al.*, 1996) ou encore *V. harveyi* pathogènes de crustacés, poissons et mollusques (Austin et Zhang, 2006). Chez l'huître creuse, en plus de la pathogénicité démontrée de certains isolats appartenant aux espèces *V. splendidus* et *V. aestuarianus*, il a été mis en évidence des phénomènes d'agonisme et de synergie aux niveaux intra- et interspécifiques, respectivement (Gay, *et al.*, 2004b; Saulnier, *et al.*, 2010),

suggérant l'existence d'autres types d'interactions entre les différentes espèces de *Vibrio* présentes chez l'huître creuse.

Par ailleurs, des expérimentations réalisées au cours de cette thèse ont permis de démontrer l'existence d'un phénomène actif et rapide d'interaction spécifique entre les hémocytes de l'huître, seules cellules immunocompétentes connues à ce jour, et la souche bactérienne pathogène vivante *V. splendidus* LGP32-GFP. En effet des expérimentations de mises en contact *in vitro* de *V. splendidus* LGP32-GFP avec des prélèvements d'hémolymphe totale (non centrifugés au risque d'altérer les cellules ou de supprimer des composés de la fraction acellulaire essentiels au phénomène de phagocytose) ont permis de mettre en évidence des mécanismes de phagocytose accompagnés ou non d'un effet cytopathogène. Grâce à la mise au point d'un protocole de cytométrie en flux permettant le suivi de la bactérie fluorescente LGP32-GFP, l'évolution de l'hémolymphe lors d'un contact avec LGP32-GFP (rapport hémocytes/*Vibrio* = 1/100) a pu être décrite (Figure 47). Le suivi de la fluorescence dans les différents compartiments hémocytaire (fenêtre H) ou bactérien (fenêtre B) montre qu'après seulement 5 min de contact, l'association entre le vibron et les hémocytes a déjà débuté puisque de nombreux hémocytes fluorescent en vert (27,2% des hémocytes totaux). Après 45 min de temps de contact, la proportion d'hémocytes fluorescents a fortement augmenté représentant 52,4 % des hémocytes totaux. Ce pourcentage d'hémocytes marqués est optimal de même que l'intensité de fluorescence des cellules, ce qui suggère l'existence d'un phénomène de saturation de la capacité de phagocytose des hémocytes.

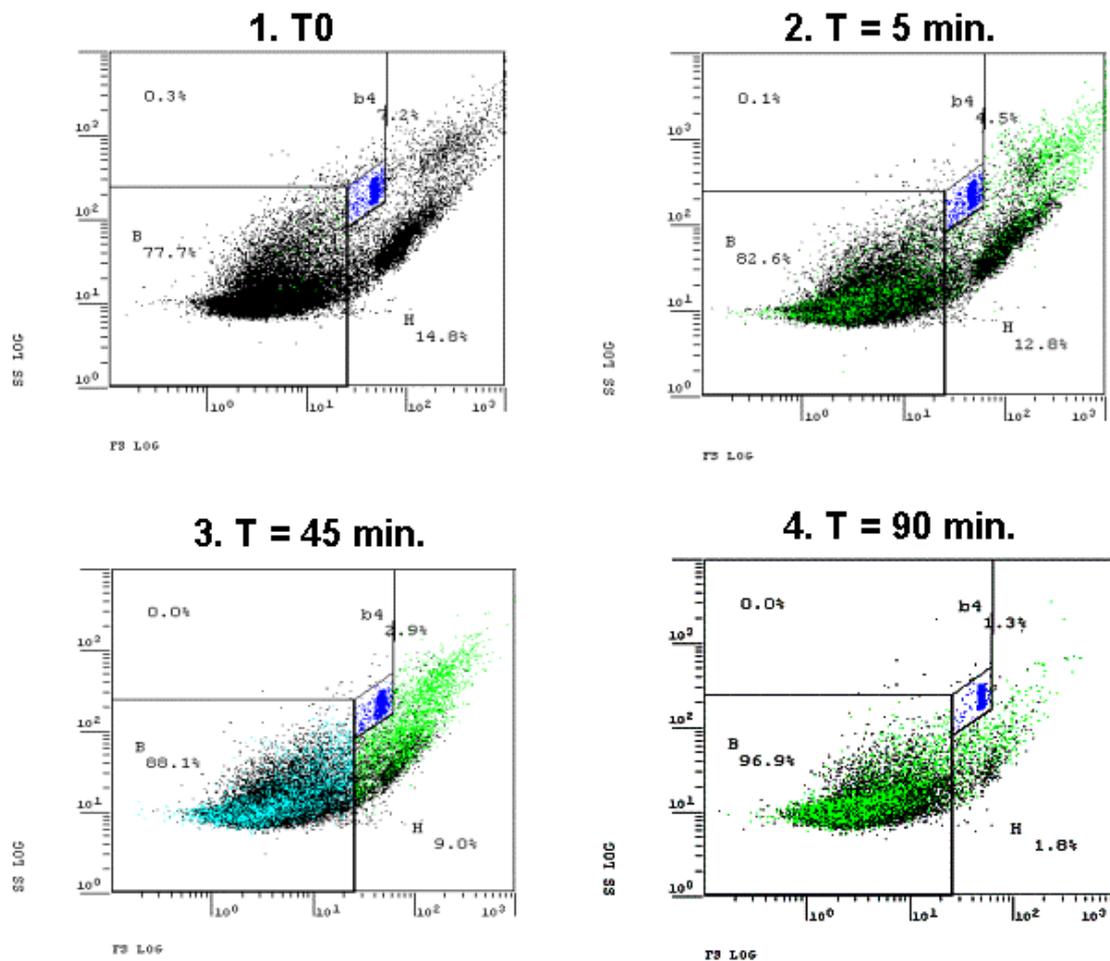


Figure 47: Cytogrammes représentant l'évolution de l'hémolymphe lors d'un contact avec LGP32-GFP (en vert ou bleu fluo) en utilisant un rapport nombre de *Vibrio* sp./nombre d'hémocytes d'huître creuse égal à 100. NB : le compartiment « b4 » (bleu foncé) représente des billes inertes utilisées pour calibrer les mesures.

Des observations au microscope à épifluorescence et en lumière blanche ont confirmé ces résultats avec la mise en évidence d'hémocytes saturés de vibrions marqués par la GFP tandis que d'autres hémocytes, moins complexes d'apparence, semblent dénués de toute activité de phagocytose (absence de marquage) (Figure 48). Après 90 min de contact, la population d'hémocytes chute, alors qu'une augmentation simultanée des bactéries LGP32-GFP libres détectées dans la fenêtre B est observée : ces observations pourraient révéler l'existence d'une lyse des hémocytes qui va de pair avec l'augmentation du pourcentage de LGP32-GFP libres retrouvés dans le compartiment B. Ces résultats suggèrent donc un possible effet cytopathogène des bactéries virulentes vis-à-vis des hémocytes, accompagné d'une libération des bactéries LGP32-GFP intra-hémocytaires toujours fluorescentes et, de ce fait, probablement toujours vivantes. Ces observations méritent cependant d'être confirmées en étant reproduites afin d'envisager par la suite une valorisation sous forme d'article scientifique.

Il est intéressant de noter que ces mêmes expérimentations ont été réalisées en utilisant une autre souche virulente en infection expérimentale, *V. aestuarianus* 02/041-GFP : une capacité de phagocytose réduite a été mise en évidence par cytométrie en flux et observation des hémocytes au

microscope à épifluorescence, confirmant des travaux antérieurs et le scénario selon lequel cette souche serait virulente par un mécanisme d'échappement à la réponse immune médiée par les phagocytes. En effet, il a pu être montré que des surnageants de culture ou ECP (extra-cellular products) produits par *V. aestuarianus* inhibaient la capacité des hémocytes d'huître à phagocyter des billes inertes fluorescentes (Labreuche, *et al.*, 2006a; Labreuche, *et al.*, 2006b).

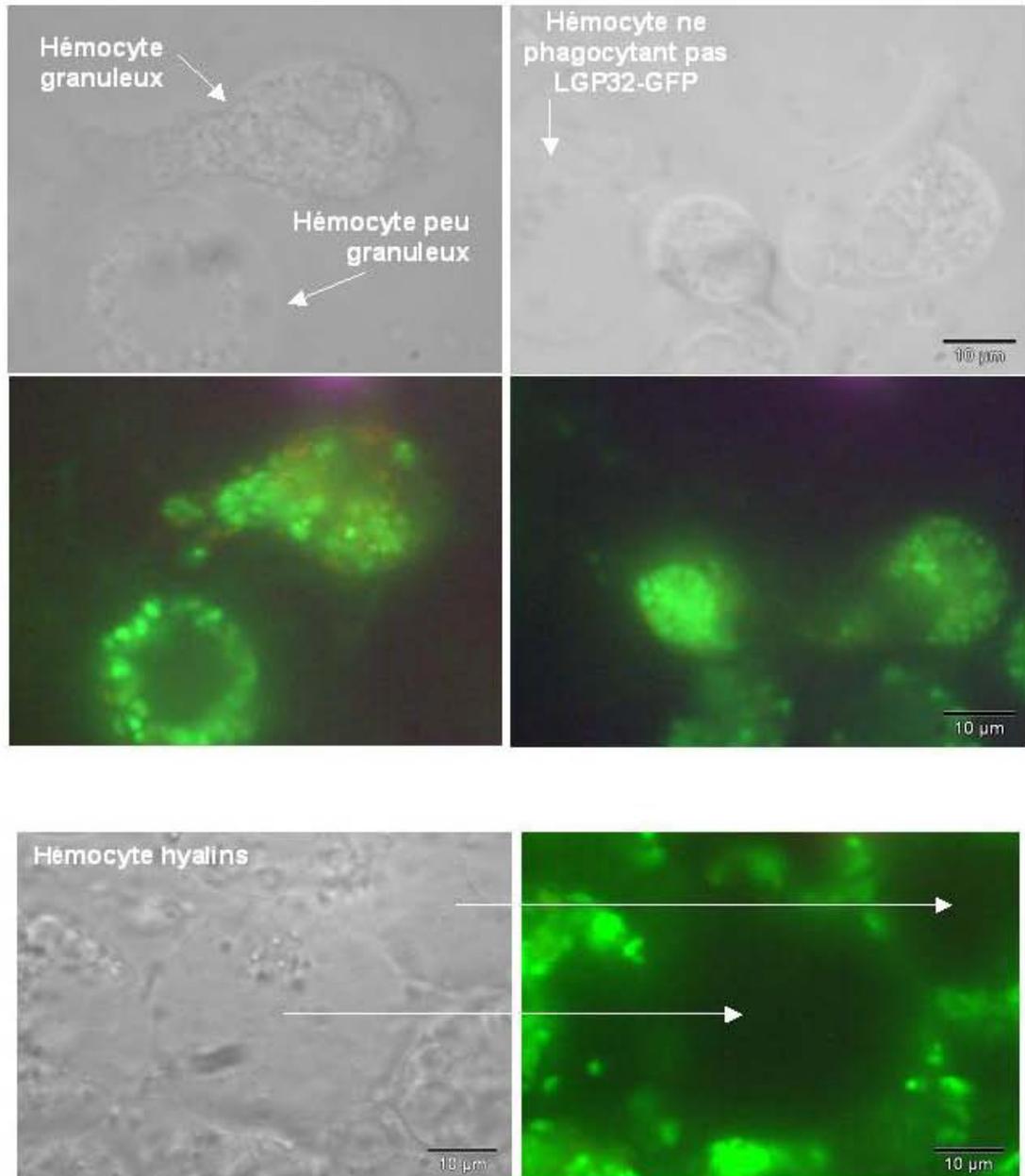


Figure 48: Observations au microscope à lumière blanche ou à épifluorescence de champs identiques d'hémolymphe mise en contact (45 min) avec *V. splendidus* LGP32-GFP. Les observations révèlent des phénomènes de phagocytose principalement observés chez des hémocytes riches en inclusions intracytoplasmiques (hémocytes granuleux).

Ces expérimentations *in vitro* de phagocytose spécifique des bactéries pathogènes *V. splendidus* LGP32-GFP par cytométrie en flux ont été réalisées à plusieurs reprises et ont permis l'observation de profils de phagocytose contrastés selon les individus : une variabilité dans la cinétique de ces profils apparaissait clairement. De plus, la proportion d'hémocytes « phagocytant » présentait également une grande variabilité individuelle selon les huîtres testées suggérant un déterminisme génétique à ce phénotype. Aussi la capacité de phagocytose d'huîtres naturellement infectées par *V. aestuarianus* s'est révélée fortement réduite vis-à-vis de la souche LGP32.

Ainsi, ces premières approches *in vitro* en cytométrie en flux couplées à des observations de microscopie à épifluorescence ont permis la mise en évidence :

- de l'existence d'interactions étroites entre hémocytes et bactéries virulentes, certaines pouvant provoquer la lyse des hémocytes capables de phagocyter (*V. splendidus* virulents) tandis que d'autres inhibent les mécanismes de phagocytose (*V. aestuarianus*) et de phénomènes d'interaction très rapides, dès les premières minutes de mise en contact *in vitro*,
- d'une grande variabilité individuelle de différents paramètres des cinétiques de phagocytose, comme la durée ou la proportion de cellules hémocytaires capables de phagocyter.

L'ensemble de ces éléments impliquant les hémocytes nous a encouragé à poursuivre la caractérisation de la réponse hémocytaire aux infections par des vibriens pathogènes en s'appuyant sur l'analyse des transcrits de gènes déjà relatés dans la littérature scientifique. De plus la rapidité des interactions et la variabilité inter-individuelle observées *in vitro* ont également permis d'ajuster notre plan d'analyses associé aux infections expérimentales réalisées par cohabitation (cf. ci-après) : l'ensemble des analyses ultérieures a été réalisé au niveau individuel, des gènes hémocytaires décrits dans la littérature scientifique comme étant impliqués dans les mécanismes de défense ont été ciblés pour l'étude d'interaction hôte-*Vibrio* au niveau transcriptionnel et enfin, les cinétiques d'infection ont également porté sur les mêmes ponctions d'hémolymphe prélevées individuellement à des temps courts d'infection expérimentale.

2 Article 4 : Evidence of an immediate but short term response of *Crassostrea gigas* oyster induced by virulent or avirulent *Vibrio* bacteria.

Sophie De Decker, Denis Saulnier

Submitted in Applied and Environmental Microbiology, June 29th 2010

Synthèse de l'article 4

Un modèle d'infection expérimentale utilisant une voie non invasive a été développé dans le but d'explorer des interactions liant l'huître creuse *C. gigas* et les *Vibrio* virulents, *V. splendidus* LGP32-GFP et *V. aestuarianus* 02/041, ou non virulents présents naturellement dans la flore endogène de l'hémolymphe ou dans l'eau des aquariums. Ce protocole consistait en deux conditions de cohabitation :

- 1/ dans une première condition dite « condition d'infection », des huîtres saines « sentinelles » ont été mises en contact avec des huîtres préalablement infectées par injection d'un mélange des deux *Vibrio* pathogènes puis sacrifiées ;
- 2/ dans une deuxième condition dite « condition contrôle », des huîtres « sentinelles contrôles » ont été mises en contact avec des huîtres ayant subi une injection intramusculaire d'eau de mer artificielle stérile et sacrifiées.

Contrairement au protocole d'injection intra-tissulaire qui court-circuite probablement les premières lignes de défense de l'hôte, cette procédure d'infection expérimentale par cohabitation avait pour finalité de s'approcher des conditions d'infection prévalant dans le milieu naturel et d'explorer la dynamique de transmission horizontale de *Vibrio* entre individus infectés et sains. Ce protocole de cohabitation a permis de révéler l'induction de mortalités de type vibriose atteignant un taux de 27% seize jours après le début de la cohabitation, alors qu'aucune mortalité significative n'a été observée dans la condition contrôle. Par ailleurs, des outils de PCR quantitatives en temps réel ont été développés pour les analyses des prélèvements individuels d'hémolymphe d'huîtres vivantes et d'eau de mer des aquariums, réalisés dans les deux conditions expérimentales (Contrôle ou Infection aux *Vibrio* virulents) à des temps successifs suivant le début de la cohabitation (2h, 6h, 8h, 24h, 48h, 7 jours et 19 jours). Les cinétiques des *Vibrio* virulents et de la flore vibrionacée totale dans l'hémolymphe et dans l'eau des aquariums ont pu être décrites. En parallèle, l'évolution des niveaux d'expression de 4 gènes hémostasiques décrits dans la littérature comme étant impliqués dans les mécanismes de défense de l'huître, à savoir *Cg-BPI*, *Cg-EcSOD*, *Cg-IκB* et *Cg-TIMP*, ont également été analysés dans ces mêmes échantillons d'hémolymphe.

Ainsi, il a été montré que *V. splendidus* LGP32-GFP et *V. aestuarianus* 02/041 infectaient dès deux heures de cohabitation les huîtres sentinelles qui présentaient alors des charges individuelles variables, comprises entre $4.5 \cdot 10^2$ et $2 \cdot 10^4$ UFC/mL d'hémolymphe. Après deux heures de cohabitation, ces deux *Vibrio* pathogènes ont également été détectés dans l'ensemble des tissus analysés, manteaux, branchies, palpes labiaux et glandes digestives notamment, à des concentrations comprises entre $3.6 \cdot 10^2$ et $1.04 \cdot 10^6$ UFC/g de tissu. De façon simultanée, une augmentation d'un facteur 10 de la flore vibrionacée totale a été observée chez les huîtres sentinelles contrôles. De plus,

l'étude des interactions hémocyte-bactérie au niveau transcriptionnel (par rapport à un T0) a révélé chez ces mêmes huîtres sentinelles contrôles, des augmentations significatives des niveaux des transcrits des 4 gènes hémocytaires analysés, après seulement deux heures de cohabitation, d'un facteur compris entre 6.6 à 78.5, selon le gène considéré. A l'inverse, chez les huîtres sentinelles mises en présence d'huîtres infectées par *V. splendidus* LGP32-GFP et *V. aestuarianus* 02/041, ces mêmes gènes présentaient des sous-expressions significatives par rapport aux niveaux de transcrits quantifiés chez les individus contrôles, selon un facteur compris entre 9.2 à 29 en fonction du gène ciblé. Par la suite, alors que les huîtres sentinelles maintenaient des niveaux d'infection significatifs à *V. splendidus* LGP32-GFP et *V. aestuarianus* 02/041 au cours de 48 heures de cohabitation, aucune modulation significative des niveaux d'expression des 4 gènes hémocytaires n'a été observée chez les huîtres sentinelles contrôles ou infectées au cours de cette période suivant les deux heures post-cohabitation.

Cette nouvelle approche a permis de mettre en évidence la rapidité de transmission des *Vibrio* virulents des huîtres infectées aux huîtres sentinelles en moins de deux heures, accompagnée d'une perturbation significative, précoce et transitoire de la réponse immunitaire de l'hôte au cours des six premières heures de cohabitation. Enfin, compte tenu de la stabilité relative retrouvée des niveaux de transcrits mesurés aux temps suivants (6h, 24h et 48h), il semblerait que les gènes ciblés dans cette étude ne soient pas ou peu corrélés aux mécanismes de résistance aux vibrioses expérimentales.

Title

Evidence of an immediate but short term response of *Crassostrea gigas* oyster induced by virulent or avirulent *Vibrio* bacteria.

Submitted in Applied and Environmental Microbiology, June 29th 2010

Authors

Sophie De Decker¹, Denis Saulnier^{1*}

¹ Ifremer, Laboratoire de Génétique et Pathologie, La Tremblade, France

* Corresponding author: Denis.Saulnier@ifremer.fr

Running title

Virulent *Vibrio* and *C. gigas* dynamic interactions.

Abstract

The understanding of reciprocal interactions between *Crassostrea gigas* and virulent or avirulent *Vibrio* sp. are of first importance to implement methods aimed at improving cultured oysters health status. A unique non invasive experimental infection model was outlined here to explore these interactions and monitor mortality events. The dynamics of virulent or avirulent *Vibrio* sp. in both hemolymph of sentinel animals and tank seawater have been studied, in parallel with the expression of four genes involved in oyster immune defense *i.e.* *Cg-BPI*, *Cg-EcSOD*, *Cg-IκB*, *Cg-TIMP*. Our results show that virulent *V. splendidus* and *V. aestuarianus* strains rapidly infected sentinel individuals, after only two hours cohabitation. Simultaneously an approximately ten fold increase of *Vibrio* population and upexpression of targeted genes from 6.6 to 78.5-fold were observed in sentinel control animals. In contrast, oysters exposed to harmful bacteria had mean expression levels strongly down-regulated by a factor of 9.2 to 29 depending on gene, when compared with those of control animals. Although oysters were still found infected by virulent *Vibrio* after six to 48 h post cohabitation survey, no significant differences were noted when comparing levels of each transcript in control and infected oysters at a same sampling time during this period. Taken together our data support both the hypothesis that virulent *Vibrio* rapidly and significantly disturb the immune response of this invertebrate host but in an early and transient state occurring during the first six hours post horizontal transfer challenge, and that expression of targeted genes is not correlated to vibriosis resistance.

Keywords

Crassostrea gigas-Vibrio interactions, pathogenesis, immune response, non invasive experimental challenge, real-time PCR.

Introduction

As pointed out by Virgin (47), all organisms are surrounded by harmless and harmful microbes and such reciprocal interactions have produced during their life histories homeostasis between host and some microbes defined as commensals or pathogens, whereas others, opportunists, change of status depending on the immune abilities of the host. Such host-microbes interactions have been observed in *Crassostrea sp.* oysters, with the description of several commensal bacterial species found not only in the digestive tract but also in the hemolymph and other soft tissues, resulting probably from both to their filter-feeding behaviour and their open circulatory system (2, 29, 30, 35). As matters stand dominant bacteria found in *C. gigas* hemolymph are Gram negative and belong to *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Alteromonas* and *Aeromonas* genus with concentration above 10^2 bacteria per ml as evaluated by classical culture counting method (30). Such tolerance regarding commensal bacteria, is explained by a differential response of the oyster immune system involving phagocytic properties of hemocytes and humoral factors, depending on the considered bacterial species and strains tested amongst those of concern for human health (15, 35). In this first study, it has been shown that fecal pollutants *Escherichia coli* and *V. cholerae*, were quickly destroyed by phagocytosis in oyster hemolymph whereas food born pathogens such as particular strains of *V. vulnificus* producing an outer polysaccharide capsule, persisted longer in the hemolymph and were seemingly, by some unknown mechanisms, resistant to digestion in hemocytes phagolysosomes.

Besides sanitary considerations, other bacterial species or strains such as those related to *V. splendidus* polyphyletic group or *V. aestuarianus*, have been found to be pathogenic to *C. gigas* oysters in French breeding area (5-7, 18, 21, 48) and have been frequently identified in coastal marine environment as part of the bacterioplankton communities (42). These *Vibrio* species or strains have been shown not only to be closely associated with mortality events occurring mainly during the hot season when they were found dominant and in abnormal concentration up to 10^4 colony forming units per ml (CFU ml⁻¹) of hemolymph, but also to be pathogenic by experimental oyster infection (38). However the classical distinction between pathogen and opportunist remains problematic since impairments of *C. gigas* defense reaction could occur during natural mortality outbreaks or in experimentally induced diseases. Indeed, De Decker *et al*, (3) have explored certain host susceptibility components to experimentally-induced vibriosis such as gametogenesis and ploidy by using two strains related to *V. splendidus* and *V. aestuarianus*.

Because oyster defense cellular mechanisms rely mainly on hemocytes, we decided to focus our study on hemocytes-bacteria interactions at a transcriptional level. Four well characterized genes known as involved in *C. gigas* defense mechanisms, have been used here. The expression of *C. gigas* BPI gene (*Cg-bpi*) encoding for a bactericidal permeability increasing protein (BPI) of *C. gigas*, could be induced in hemocytes after oyster heat-killed bacterial challenge and was detected by *in situ*

hybridization (11). *Cg-EcSOD* is shown to be the major plasmatic multifunctional protein in *C. gigas*, whom gene expression and production are restricted to hemocytes. This protein presumably binds to bacteria and lipopolysaccharide (LPS) and, having a superoxyde dismutase (SOD) activity, could be involved in phagocytic mechanisms (12, 16, 17). A putative *Cg-IκB* protein was identified by an expressed-sequence-tag approach (27): the inhibitors of NF-κB (IκBs) have been pointed out as major components of the Rel/NF-κB signaling pathway, an important mediator of the immune responses in vertebrates and insects. *Cg-TIMP* is an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from *C. gigas*. Its potential role in wound healing and defense mechanisms in this species was illustrated by the induction of its gene expression in hemocytes, following shell damage or a non virulent bacterial challenge (17, 26, 28).

To describe the reciprocal interactions between *C. gigas* and virulent or avirulent *Vibrio sp.*, a non invasive experimental infection model of diploid *C. gigas* oysters was developed as part of the present study, using a procedure of horizontal transmission of *Vibrio* bacteria through cohabitation trials. It consisted in placing healthy oysters referred to as sentinel animals in the same tank as oysters that were preliminary experimentally infected or mock infected by injection with virulent *Vibrio sp.* or sterile artificial sea water respectively, and sacrificed by severing their adductor muscle at time zero of commencing the cohabitation experiment. The dynamics of both virulent *Vibrio sp.* and total *Vibrio* population in the hemolymph of sentinel animals and in tanks seawater, as well as the expression of four hemocytic genes well characterized in the literature and involved in defense reactions, were studied simultaneously in individual animals, using real time PCR techniques developed for the purpose of this study.

Material and Methods

Oysters

Two-years old diploid oysters (*Crassostrea gigas*, Mean total fresh weight = 4.6 ± 1.3 g) from natural recruitment were collected from a commercial farm (Perquis, Bassin de Marenne-Oléron, Charente Maritime) and maintained for six months in an indoor infrastructure, with a daily monitoring (Ifremer, La Tremblade). These oysters were presumed to be healthy because no oyster died during this six month observation period and checked for OsHV-1 and *V. aestuarianus* DNAs.

Bacterial strains and culture conditions

Virulent *Vibrio splendidus* LGP32-GFP strain and *V. aestuarianus* 02/041 strain (5) were cultured in Marine Broth (MB) purchased from Difco prepared as follows: peptone 4%, yeast extract 1% diluted in Sterile Artificial Sea Water (SASW 2,3% NaCl, 20 mM KCl, 5 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂). Bacteria were grown at 20°C for 20 h under constant shaking. The bacterial culture concentrations were evaluated spectrometrically at an optical density (OD) of 600 nm. Cells were centrifuged at 3,200 g for 10 min and the resulting pellet resuspended in SASW to an OD of two, corresponding to 2×10^9 CFU ml⁻¹. A mix of both bacterial cells (v/v) was prepared for individual injection.

Both strains have been whole sequenced with GeneBank accession numbers NC_011753, NC_011744 for the two chromosomes of *V. splendidus* LGP32 strain and concerning *V. aestuarianus* 02/041 strain, gene submission in GenBank is not yet achieved.

Experimental infections by intramuscular injections followed by cohabitation

Oysters were anaesthetised for one to two hours at 20°C in a solution of magnesium chloride (28 g l⁻¹ MgCl₂) supplemented with phytoplankton (*Isochrysis galbata* and *Chaetoceros calcitrans*) under aeration. Subsequently, 100 µl of a mix of virulent *V. splendidus* LGP32-GFP and *V. aestuarianus* 02/041 bacterial suspensions at equal doses of 10^8 CFU ml⁻¹ as described in Saulnier *et al.* (38), were injected into the adductor muscle of oysters. Another group of oysters were injected with SASW to serve as negative controls (mock infection). After injection, oysters were transferred to tanks filled with 1 µm-filtered seawater at 3.1‰ of salinity and maintained under static conditions at 20°C with aeration. Twenty four hours after mock infection or challenge by virulent bacteria, surviving animals were sacrificed removing one valve by severing their adductor muscle. The other valve and flesh were transferred in cohabitation tanks designated as “control tank” or “virulent *Vibrio* tank” at time zero. The control tank consisted of a cohabitation of 30 healthy oysters, referred to as sentinel control

oysters, with sacrificed, mock infected, SASW injected oysters. The virulent *Vibrio* tank consisted of a cohabitation of 200 healthy oysters (referred to as sentinel *Vibrio* oysters) with sacrificed challenged *V. splendidus* and *V. aestuarianus* injected oysters. A ratio of five sentinel oysters to one injected was used and the total density was five ind. l⁻¹. After 48 hours of cohabitation, all injected oysters were removed and the tanks seawater was replaced with 1 µm-filtered UV treated seawater at 3.1‰ of salinity. All experiments were performed under static conditions at 20°C with water aeration, without supplementation of food. At each cohabitation time T0, T1 = 2 h, T2 = 6 h, T3 = 8 h, T4 = 24 h, T5 = 48 h and post-cohabitation time T6 = 7 d, T7 = 19 d, ten oysters were transferred from the *Vibrio* tank and placed individually into small aquaria. Mortality was monitored daily and any newly dead oyster was removed from the *Vibrio* tank over a 19-days period.

Hemolymph, oyster soft tissues and tanks seawater sampling

Individual samples of hemolymph were collected from live sentinel oysters, from both control tank (n = 3) and *Vibrio* tank (n = 9), at eight time points (T0, T1 = 2 h, T2 = 6 h, T3 = 8 h, T4 = 24 h, T5 = 48 h, T6 = 7 d, T7 = 19 d). Briefly, after removing oysters from the tanks, a small hole was pierced with stripping pliers into the posterior region of the shells to allow the removal of fluids from pallial cavity. Hemolymph was immediately withdrawn from the adductor muscle using a syringe fitted with a 23-gauge needle. Oyster flesh was severed from shell using a scalpel and stored individually at -20°C. One millilitre of seawater was collected from both tanks at each time points and stored at -80°C.

Bacteria quantification by real-time PCR

DNA extraction procedures

Individual samples of hemolymph (200 µl) and tank seawater (500 µl) were centrifuged at 10 000 g for five minutes. DNAs were extracted from cells pellets using QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions. The same DNA extraction procedure was followed using 20 mg of oyster tissues collected from various organs. Pelleted DNAs were resuspended in 200 µl of ultra pure water. DNA yields and their purity determined spectrometrically (Eppendorf). DNA extracts were stored at -20°C until use.

Real-time PCR assay analyses

Three real-time PCR assays were used for the specific detection and quantification of the *V. splendidus* LGP32-GFP strain, and bacteria related to *V. aestuarianus* and to *Vibrio* genus, targeting respectively the *GFP*, *dnaJ* and *16S rRNA* genes. GFP-qPCR test was developed for the purpose of this study using Taqman chemistry and the same PCR conditions as those used for *V. aestuarianus*

qPCR detection (37). The sequences of oligonucleotides and Taqman probes used here are shown in Table 1. They were assessed for species specificity using a BLAST search to determine homology to known sequences. Concerning the detection and quantification of bacteria related to the *Vibrio* genus, we used the qPCR protocol described by Thompson *et al.*, (43) with slight modifications made as required for the quantification of amplicons by Sybr green chemistry. Each PCR assay was run in duplicate in a final volume of 25 μ l containing 5 μ l DNA sample, 200 nM of each primer (Table 1) and 12.5 μ l of 2x Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (Stratagene). Thermal cycling consisted of an initial denaturation step at 95°C for 10 min followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 10 s, annealing and extension at 65°C for 30 s. Lastly, the amplicons melting temperature curve was analysed during one cycle at 95°C for 30 s, 55°C for 30 s and 95°C for 30 s. Real-time PCR assay was conducted on MX3000 Thermocycler (Stratagene) and fluorescence intensity was expressed in delta reporters (dR) after background subtraction. Threshold was set using an amplification based algorithm from MX3000 software (Stratagene) for the initial plate. For other plates we used an interplate calibrator to set the threshold manually. Threshold Cycle (Ct) value corresponded to the PCR cycle number at which an increase in reporter fluorescence above a baseline signal was first detected.

Table 1 : Nucleotide sequences and melting temperature (Tm) of primers and probes used in real-time PCR assays.

Name	Function	Sequence (5'–3') and fluochromes	Tm (°C)	Ref.
<i>GFP-F</i>	Forward primer	TCAGTGGAGAGGGTGAAGGT	60	This study
<i>GFP-R</i>	Reverse primer	TACATAACCTTCGGGCATGG	61	This study
<i>GFP probe</i>	TaqMan PCR probe	Cy5- TGTTCCATGGCCAACACTTGTCA -BHQ1	68	This study
<i>DNAj aes F1</i>	Forward primer	GTATGAAATTTTAACTGACCCACAA	58	(Saulnier <i>et al.</i> , 2009)
<i>DNAj aes R1</i>	Reverse primer	CAATTTCTTTTGAACAACCAC	59	(Saulnier <i>et al.</i> , 2009)
<i>DNAj probe</i>	TaqMan PCR probe	Texas Red-TGGTAGCGCAGACTTCGGCGAC-BHQ2	71	(Saulnier <i>et al.</i> , 2009)
567F	Forward	GGCGTAAAGCGCATGCAGGT	64	(Thompson <i>et al.</i> , 2004)

Name	Function	Sequence (5'–3') and flurochromes	Tm (°C)	Ref.
	primer			
680R	Reverse primer	GAAATTCTACCCCCCTCTACAG	66	(Thompson et al., 2004)

Standard curves for the detection of LGP32-GFP and bacteria related to *Vibrio* genus were established using 1:10 serial dilutions of DNAs extracted from *V. splendidus* LGP32-GFP strain and *V. aestuarianus* 02/041, after challenge with a mix of DNA extracted from both 2×10^6 cells ml⁻¹ of *Photobacterium phosphoreum* and *Shewanella colwelliana* reference strains. The quantification of bacterial cells by real-time PCR was compared to the enumeration of bacterial cells used for DNA extractions, by light microscopy in a *Malassez* counting chamber.

Analysis of gene expression in hemolymph by real-time PCR

Hemocytes RNAs extraction procedures

Total RNAs were isolated from individual hemolymph samples (600 µl) centrifuged at 800 g for five minutes, using a commercial RNA purification kit (RNeasy Mini Kit, Qiagen) including a DNase treatment. RNA concentrations in each sample were estimated using the Quant-It™ Ribogreen® reagent and RNA standard curves (Stratagene) and the plates read on a Stratagene's MX3000 thermal cycler. The quality of extracted RNAs was checked by agarose gel electrophoresis using 20 randomly selected RNA samples.

Real-time PCR analysis of gene expression

The expression levels of four different mRNA transcripts, *Cg-BPI*, *Cg-EcSOD*, *Cg-IκB* and *Cg-TIMP*, were determined by real-time PCR on MX3000 Thermocycler (Stratagene). An elongation factor encoded by the *ef I* gene was used to provide a steady-state level of expression of a house-keeping gene allowing an internal control for gene expression as described in previous work done with the mollusks *C. gigas* and *Mya arenaria* (14, 16, 17, 23, 26, 40). Approximately 100 ng of individually isolated RNAs were reverse-transcribed in a final volume of 20 µl using an optimized blend of oligo-dT and random primers (Qiagen) and a mix of two reverse transcriptases (Quantiscript Reverse Transcriptase, Qiagen) according to the manufacturer's instructions (Quantitect Reverse Transcription Kit, Qiagen). cDNAs were amplified by real-time PCR using specific primers designed by Primer 3 software choosing for general conditions an optimal annealing temperature of 60 +/- 1°C for pairs of oligonucleotides, the conserved regions for primer design deduced from GenBank available targeted

sequences alignment, and an amplicon size under 300 bp (Table 2). The real-time PCR assay was performed in duplicate in a total volume of 25 μ L using the Brilliant SYBr Green QPCR master mix (Stratagene), with 200 nM of each primer. The thermal cycle was performed with a two-step PCR: one cycle at 95°C for 10 min followed by 40 cycles at 95°C for 30 s, 60°C for 60 s and 72°C for 60 s and ended by one cycle at 95°C for 60 s, 60°C for 30 s and 95°C for 30 s aimed at melting temperature curve analysis. All Fluorescence thresholds for the first and consecutive PCR plates were set as indicated above for bacteria quantification by qPCR, using cDNAs prepared from the pool of hemocytes collected at time zero as interplate calibrator. PCR efficacies ($E = 10^{(-1/\text{slope})}$) and linear regression analysis were calculated by drawing standard curves from a serial dilutions analysis of these cDNAs, testing each dilution in triplicate.

The calculation of relative mRNA levels was based on the comparative Ct method (22) modified by Pfaffl (34). The fold change Q_r in the target gene, normalized to *efI* gene and relative to expression at time zero using a pool of 11 cDNAs obtained from 11 hemolymph samples collected at T0, just before the beginning of cohabitation trial, was expressed for each sample as $Q_r = [(E_{\text{target}})^{\Delta C_{t_{\text{target}}}}]^{(\text{pool T0} - \text{sample Tx})} / [(E_{\text{efI}})^{\Delta C_{t_{\text{efI}}}}]^{(\text{pool T0} - \text{sample Tx})}$.

This calculation was performed on all individual samples of cDNAs collected from both sentinel control oysters ($n = 3$ at each time point) and sentinel oysters exposed by cohabitation to virulent *Vibrio* strains ($n = 9$ at each time point).

Table 2: Primers used for the real-time PCR quantification of cDNA. For each gene, oligonucleotide sequences were derived from the analysis of sequence alignment of several identified *C. gigas* cDNA sequences available in GenBank, selecting conserved cDNA region. Primer 3 software was used to design forward and reverse PCR primers in the open reading frames, taking into account the optimal thermal and chemical conditions for PCR amplification compatible with a qPCR assay. The primers were checked for specificity using a BLAST search to determine homology to known sequences. Two to three primer pairs per gene were tested for their efficacy and specificity in real-time PCR, leading to the selection of only one couple of primers for further gene expression analysis done in this study.

Targeted Genes	Primers name	Oligonucleotide sequences (5' – 3')	Amplicon length (bp)
<i>Cg-efI</i>	EFF EFR	AGTCACCAAGGCTGCACAGAAAG TCCGACGTATTTCTTTGCGATGT	199
<i>Cg-BPI</i>	S-BPI1F S-BPI1R	TGACGTCAGCCCAATGTAAG ACTGCTGGGCTTTGTGAACT	200
<i>Cg-EcSOD</i>	S-SOD2F S-SOD2R	CGAGATGGAACCAAACCACT GACGTTGAAACCGGTCAGAT	124
<i>Cg-IkB</i>	S-IKB3F S-IKB3R	TCCAGACCCCTCTTCATTTG CAGGGCGATATCGTCATACC	152
<i>Cg-TIMP</i>	S-TIMP1F S-TIMP1R	TGGTGTGACCGTTCTCTGT AGAACCCAGCAGAGATGACC	227

Statistical analysis

To analyse the degree of linear relationships i) between both virulent *Vibrio* quantifications in tank water and in individual hemolymph of sentinel oysters and ii) between *Vibrio* population quantifications in tank water and in individual hemolymph of sentinel oysters at the same time point, Pearson's correlations were measured (XLSTAT-Pro). Difference in *efI* Ct individual means between control and *Vibrio* condition was tested using a Bonferroni test (16). The fold changes of defense-associated gene transcripts were tested for significant difference between control and virulent *Vibrio* sentinel oysters for a same cohabitation time and between two consecutive sampling times for a same batch of oysters using unpaired Student's t test (XLSTAT-Pro).

Results

Oyster mortality monitoring

No mortality occurred during the assay in control tank where sentinel oysters cohabitated with mock infected oysters. In contrast, mortality was reported in the batches of ten oysters randomly caught from virulent *Vibrio* cohabitation tank and transferred individually into aquaria filled with UV-treated water at the different tested cohabitation times. Similar results were observed for all tested cohabitation times, oyster mortality started and peaked at day two, and ended at day 16. A short cohabitation time of two hours led to significant mortality with five dead oysters upon ten at day 14. When grouping the mortality events recorded in all aquaria, whatever the cohabitation time was, cumulative mortality rates reached 20% at day seven and 27% at day 16, thereafter the mortality stopped until the end of the survey at day 19.

Detection and quantification of total Vibrio population and of the two virulent Vibrio strains

In order to achieve diagnostic tools relevant for this study, PCR primers and a Taqman probe were designed to target and quantify the gene encoding for the Green Florescent Protein of a mutated LGP32-GFP strain, related to *V. splendidus* and pathogenic for *C. gigas*. Linear values for PCR amplification were obtained for 1:10 dilutions of purified LGP32-GFP DNA corresponding to $1.2 \cdot 10^3$ to $1.2 \cdot 10^9$ CFU of LGP32-GFP ml^{-1} , done in a mix of DNA extracted from 10^6 cells ml^{-1} cultures of respectively *P. phosphoreum* and *S. colwelliana* reference strains. Adding exogenous DNAs had no influence on PCR cycle threshold values since quantification curve exhibited a correlation and a PCR efficacy of 0.993 and 99.5% respectively (Fig. 1). Amplified PCR product size was verified by visualizing the expected 194-bp long amplicon (not shown) after agarose gel electrophoresis.

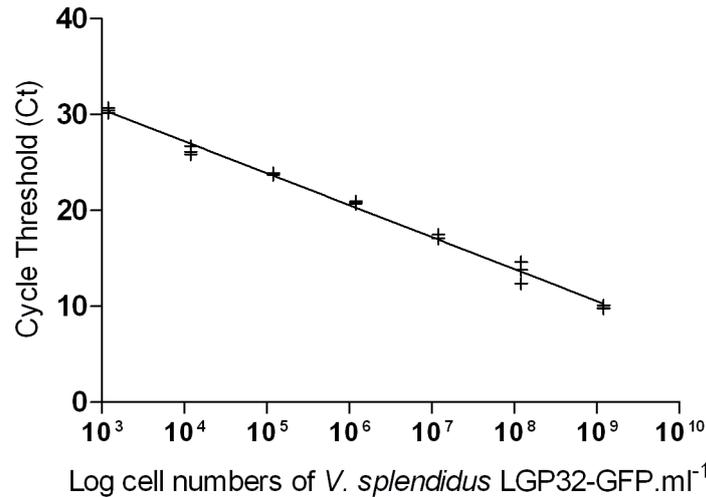


Fig. 1 : Standard curve for *V. splendidus* LGP32-GFP real-time PCR in 1:10 serial dilutions of purified LGP32-GFP DNA done in a mix of exogenous DNAs extracted from both 2×10^6 cells ml⁻¹ of *P. phosphoreum* and *S. colwelliana* reference strains, corresponding to 1.2×10^3 to 1.2×10^9 CFU of LGP32-GFP ml⁻¹. Standard curves were generated by plotting the log cell number versus the mean threshold cycle (Ct) value obtained from triplicate assays. A linear regression, represented here was obtained by collectively treating all the data with a r^2 of 0.993 and a PCR reaction efficacy of 99.5%.

Similarly PCR primers described by Thompson *et al.* (43) to quantify *Vibrio* population were evaluated using real time PCR technique based on Sybr Green chemistry. The same range of dilutions of LGP32-GFP DNA as above, as well as dilutions of purified *V. aestuarianus* 02/041 DNA done in a mix of DNAs extracted from 1×10^6 cells ml⁻¹ cultures of respectively *P. phosphoreum* and *S. colwelliana* reference strains were used. Dissociation curve analysis revealed that a single amplicon was obtained for all dilutions with melting temperature of 81.9°C and 82.5°C for LGP32-GFP and 02/041 strains respectively. Both quantification curves were similar, exhibiting correlations of $r^2 = 0.997$ and 0.976 and PCR reaction efficacies of 99% and 96% when dilutions of LGP32-GFP and 02/041 strains ranged from 2×10^8 to 2×10^2 cells ml⁻¹ (data not shown). Treatment of Ct values collectively yielded a single quantification curve with correlation and PCR reaction efficacy of 0.992 and 95% respectively (Fig. 2). The sensitivity of real time PCR was evaluated to be 2×10^2 *Vibrio* cells ml⁻¹ which corresponded to one cell/PCR well.

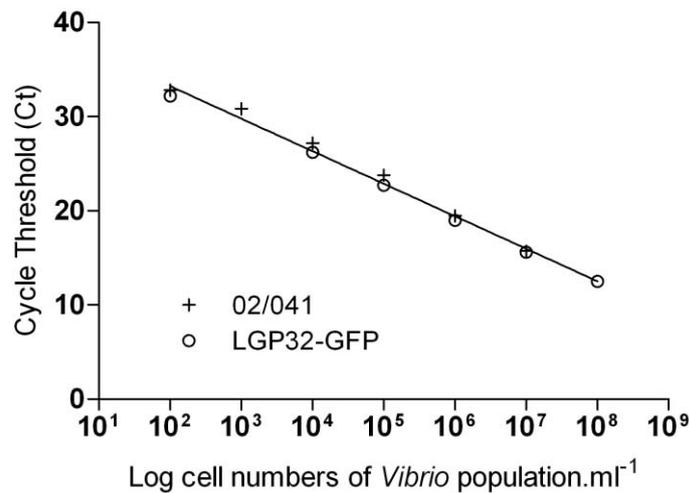


Fig. 2: Standard curve for *Vibrio* population real-time PCR in 1:10 dilutions of purified LGP32-GFP (+) and *V. aestuarianus* 02/041 DNA (o) done in a mix of DNAs extracted from both 2×10^6 cells ml⁻¹ of *P. phosphoreum* and *S. colwelliana* reference strains. Standard curves were generated by plotting the log cell number versus the mean threshold cycle (Ct) value obtained from triplicate assays. A single linear regression, represented here, was obtained by collectively treating all the data with a r^2 of 0.992 and a PCR reaction efficacy of 95%.

Despite the use of one μm -filtered seawater, the quantification of *Vibrio* population in tanks water used in cohabitation trials revealed high concentrations of 0.9×10^4 and 1.1×10^4 CFU ml⁻¹ in control and virulent *Vibrio* tanks respectively at time zero (Fig. 3). This population increased by a factor twenty in virulent *Vibrio* tank as soon as two hours post cohabitation and stabilized to approximately 3×10^5 CFU ml⁻¹ later on all along the water survey, similarly to control tank seawater but this last stabilized to approximately 3×10^4 CFU ml⁻¹. With regards to individual assessments of the bacterial strains used, both LGP32-GFP and 02/041 were found at high concentrations in tank seawater two hours post cohabitation challenge, respectively 3×10^3 and 2×10^4 CFU ml⁻¹. A slight decrease or increase depending on strain was then observed between eight and 24 h post cohabitation. After having replaced the tanks seawater with UV treated seawater at the end of cohabitation time (48 h), a significant decrease of *Vibrio* population was noticed at day seven and in both tanks. At this time, LGP32-GFP was nearly undetectable whereas 02/041 strain could still be found in the tank water.

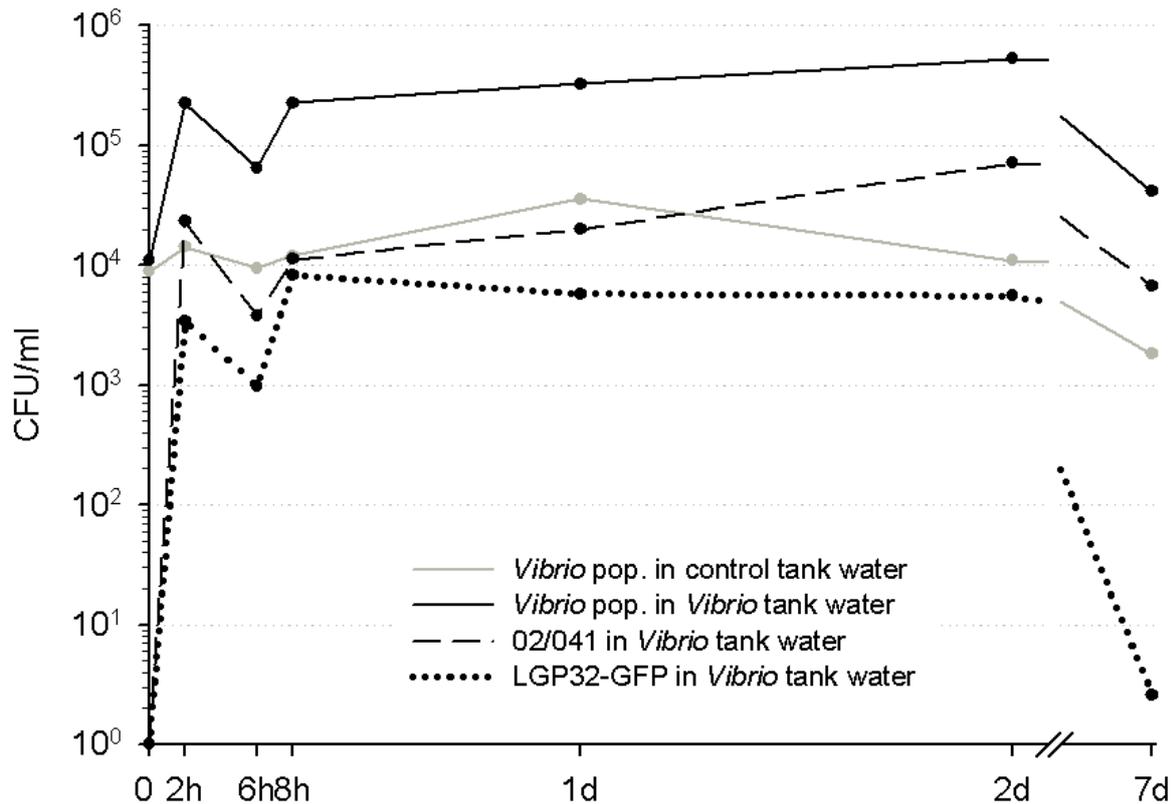


Fig. 3: Kinetics of total *Vibrio* population and of the two virulent LGP32-GFP & 02/041 *Vibrio* strains quantified by qPCR in both control and *Vibrio* tank water samples from T0 to day seven.

Strong quantitative and qualitative variations of bacterial loads in the hemolymph of sentinel oysters were observed depending on the cohabitation time and cohabitation tank (Fig. 4). Mean *Vibrio* population quantification in the hemolymph of oysters from control tank increased from $2.6 \pm 1 \cdot 10^4$ to $1.7 \pm 2.9 \cdot 10^5$ CFU ml⁻¹ in the first two hours of cohabitation time and at time six hours, already returned to the value measured in tank water, *i.e.* 10^4 CFU ml⁻¹.

In contrast, virulent *Vibrio* were found to infect very quickly almost all of the sentinel oysters with concentrations in hemolymph increasing from a non detectable level (0 CFU ml⁻¹) at time zero, to $5 \pm 8.9 \cdot 10^2$ or $7 \pm 6.8 \cdot 10^3$ CFU ml⁻¹ after only two hours cohabitation time, respectively for both quantified virulent bacterial strains, *i.e.* *V. splendidus* LGP32-GFP and *V. aestuarianus* 02/041. Furthermore virulent *Vibrio* were detected at concentrations ranging from $3.6 \cdot 10^2$ to $1.04 \cdot 10^6$ CFU g⁻¹ in the various organs tested including gills, mantle, labial palps and digestive gland. After a slight increase of *V. aestuarianus* 02/041 or decrease of *V. splendidus* LGP32-GFP strain in oyster hemolymph during the following 48 hours post cohabitation, all tested and surviving animals were found to be negative for the detection of *V. splendidus* and *V. aestuarianus* at day seven and day 19 respectively.

When the logarithmic bacterial loads of virulent *V. aestuarianus* or *V. splendidus* found in 35 individual oyster hemolymphs sampled during the first 48 h of cohabitation were compared, a positive correlation (Pearson's $r = 0.436$, $p = 0.006^*$) was obtained. A similar positive correlation (Pearson's $r = 0.745$, $p = 0.005^*$) was found in control tank between *Vibrio* population mean load found in 71 hemolymph samples and in 12 tank seawater samples from T0 to day seven.

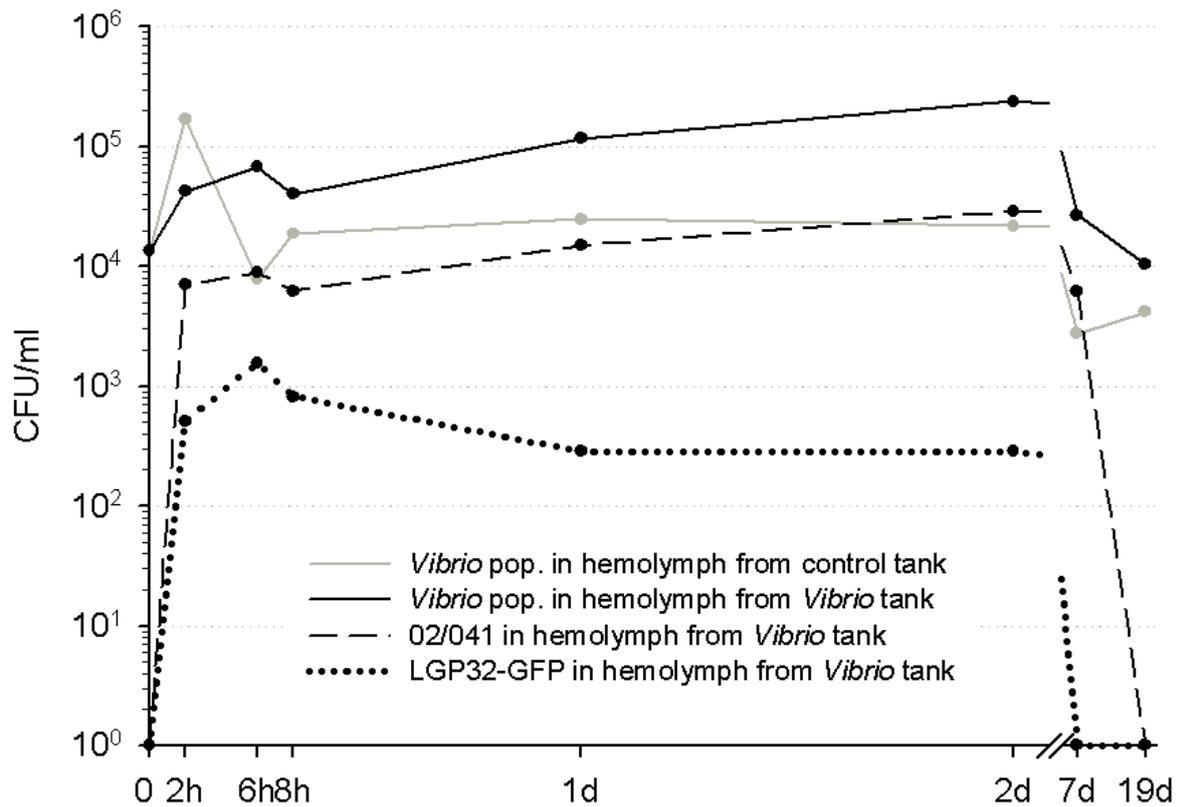


Fig. 4: Kinetics of total *Vibrio* population and of the two virulent LGP32-GFP & 02/041 *Vibrio* strains quantified by qPCR in hemolymph samples from both control and *Vibrio* tanks from T0 to day 19. Mean values obtained from individual samples collected from sentinel control oysters ($n = 3$ for each time point) and sentinel oysters challenged with virulent *Vibrio* strains ($n = 9$ for each time point).

Monitoring the expression of genes involved in defense reactions

The expression of four selected genes, known in the literature as involved in defense reactions mediated by hemocytes, were analyzed by real time PCR in order to examine their pattern of expression during the course of the trial, in relation with both virulent or avirulent *Vibrio* sp. . In a preliminary step, the efficacy of qPCR for all targeted genes including the elongation factor gene and

its ability to generate a single qPCR amplicon were both evaluated using 1:5 serial dilutions of a pool of cDNAs obtained from the 11 samples of hemolymph collected at time zero and dissociation curve analysis. Efficacies for *Cg-BPI*, *Cg-EcSOD*, *Cg-IκB*, *Cg-TIMP* and *ef I* genes were of 104.7%, 102.3%, 105.6%, 105.6%, 95.9% respectively. For all genes studied, the square regression correlation coefficient of detection ranged between 0.95 and 0.99. Dissociation curve analysis revealed that a single amplicon was obtained for all genes studied with melting temperature of 81°C, 80°C, 82°C, 82°C and 76°C respectively. The specificity of qPCR was further verified by agarose gel electrophoresis of qPCR products, visualising as expected one amplicon of the attempted size calculated upon the gene sequence data available on GenBank (not shown).

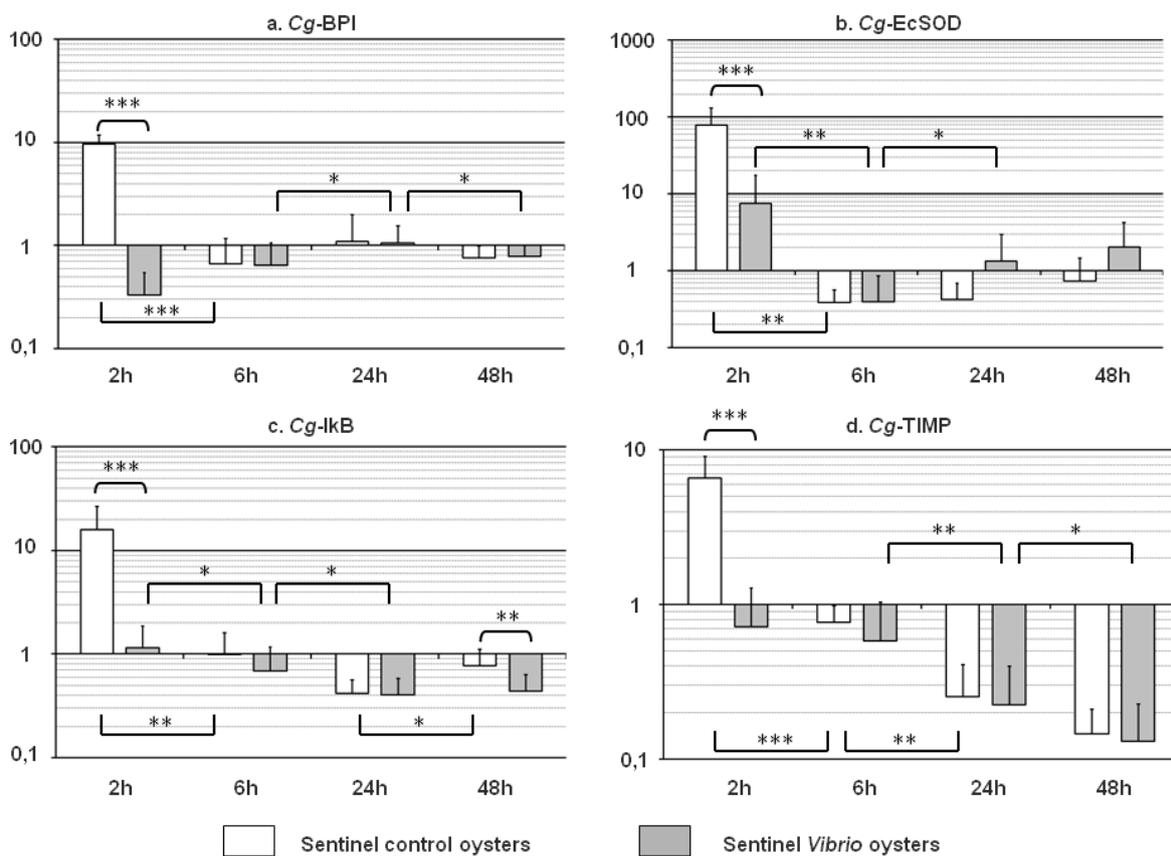


Fig. 5: Kinetics of the mean (\pm SD) relative expression of a. *Cg-BPI*, b. *Cg-EcSOD*, c. *Cg-IκB*, d. *Cg-TIMP* of both control (white bars, n = 3) and *Vibrio* (grey bars, n = 9) sentinel oysters. Standards bars correspond to integrated technical and individual variability. Gene expression is normalized to *ef I* gene and relative to expression at time zero. Asterisks indicate a significant difference in expression levels between control and *Vibrio* challenged conditions or between two consecutive sampling times (*: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.0001).

The detected amount of the housekeeping gene elongation factor mRNA did not show significant change between control and virulent *Vibrio* sentinel animals (p-value > 0,05) with mean threshold

values and standard errors between both conditions of 18.8 ± 2.2 and 19.9 ± 1.8 respectively, analysing 48 individual RNA samples. Thus, the relative expression ratio of immune genes was estimated by normalizing against *efI* gene. A significant up-regulation of the four targeted genes was observed after normalization, especially *Cg-EcSOD*, in each sentinel oysters from control tank analysed two hours after cohabitation (Fig. 5). Transcript levels for *Cg-TIMP*, *Cg-BPI*, *Cg-IκB* and *Cg-SOD* genes were respectively 6.6, 9.7, 15.9, 78.5-fold greater than their expression at time zero. In contrast, the mean relative transcript levels of genes from virulent *Vibrio* tank sentinel oysters were approximately ten-fold lower with values ranging from 0.11 (which corresponded to a down-regulation of a 9.2 factor) for *Cg-TIMP* gene to 0.03 (which corresponded to a down-regulation of a 29 factor) for *Cg-BPI* gene when compared to those obtained in control animals (Fig. 6). Values recorded for all other transcripts after a six hours cohabitation period in control or virulent *Vibrio* sentinel oysters evolved with similar patterns leading normality or down regulation depending on genes (Fig. 5). Noticeably low levels of *Cg-TIMP* transcripts were reported in both conditions at 24 h and 48 h post cohabitation with a decrease in values ranging from 0.25 to 0.13 (corresponding to a down-regulation of a 4 to 7.7 factor).

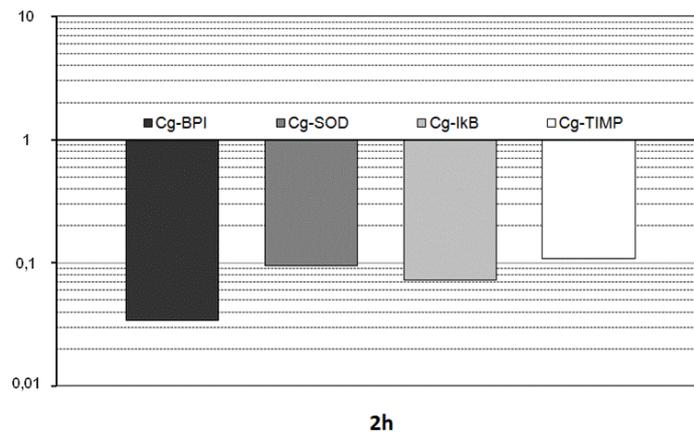


Fig. 6: Effect of virulent *Vibrio* on the mean relative expressions of *Cg-BPI*, *Cg-EcSOD*, *Cg-IκB*, *Cg-TIMP* obtained 2 h after the beginning of the cohabitation trial. The effect of virulent *Vibrio* is represented as the division of the mean relative expressions obtained for control sentinel oysters by the mean relative expressions obtained for *Vibrio* sentinel oysters of each targeted genes.

Discussion

Oysters' breeding in France is the dominating part of the aquaculture industry, *C. gigas* prevailing in a quasi-monoculture situation. As a consequence French oyster industry has evolved from traditional harvesting of wild beds to very intensive cultures. The high breeding densities featuring the French *C. gigas* cultures is favored by the settlement behavior of oysters occurring when mobile larvae reach metamorphosis. In addition, the presence of important populations of wild oysters and of other filter feeding mollusks, leads to an important trophic competition that may impair good breeding sites management and health status (24). Indeed, unexceptional mortality rates of 40 % have been regularly reported within *C. gigas* cultured young oysters over the past decade and more, occurring mainly during spring and summer seasons in France. Classically, the professional oyster breeders cope with these mortalities by increasing the numbers of these, less costly, young oysters (*i.e.* spat) in their breeding apparatus. Amongst pathogens found in close association with these mortality events reported in France, two *Vibrio* species, *V. splendidus* and *V. aestuarianus*, were found. We therefore focused our study on cohabitation experiments using these *Vibrio* species, choosing purposely a non invasive method of infection, to allow exploring the possibility of horizontal transfer of these *Vibrio* from diseased to healthy oysters. A pathogenesis study was undergone to describe the pathway of virulent and avirulent *Vibrio*, quantifying them in oyster hemolymph and in tank water and also quantifying transcripts of well characterized hemocytic genes involved in host response ranging from tissue damage repair to recognition and degradation of pathogenic bacteria.

Few data on non invasive experimental infection methods in mollusks are available. Nevertheless experimental vibriosis was conducted by Travers et al (45) and Gay et al. (6) using a balneation or cohabitation procedures in abalone *Haliotis tuberculata* and *C. gigas* respectively. Regarding oysters, other non invasive experimental infection assays have been described using a virus (OsHV-1) in larvae (20) and parasites such as *Bonamia ostreae* and *Perkinsus* spp. (19, 39). As matters stand, this article relates the development of the first experimental model targeted at better understanding the early steps of pathogenesis events in *C. gigas*. Achieving this goal was only possible after we developed appropriate specific diagnostic tools. A first evidence of successful experimental horizontal transfer of vibriosis was obtained in four independent preliminary assays we had performed by cohabitation of healthy sentinel *C. gigas* oysters and experimentally virulent *Vibrio*-infected oysters. Significant mortality rates though variable depending on batch of animals, were obtained in the virulent *Vibrio* treated group whereas no mortality was observed by contact of healthy oysters with sterile artificial seawater injected (mock infected) oysters. All tested moribund animals collected during these preliminary assays harbored high concentration of the challenged *Vibrio* in their hemolymphs, as shown by classical plate counting method. In order to synchronize as much as possible the *Vibrio* transmission events between experimentally infected oysters to sentinel oysters, we synchronized the

death of injected individuals and these last were sacrificed by severing one valve at time zero of cohabitation experiment. These animals were removed after only 48 h cohabitation both to stop the transmission of *Vibrio* from carriers and for hygiene reasons. This protocol aimed at mimicking oyster death caused in the wild by disease, predator attack, natural death or resulting from bad zootechnical practices. Furthermore, oysters were transferred individually into aquaria at different cohabitation times to prevent the occurrence of secondary *Vibrio* transmission events between sentinel oysters during the mortality survey. Since herpesvirus OsHV-1 and *V. aestuarianus* are identified as the main infectious agents associated with *C. gigas* mortality events in France (24), oysters were tested all along the cohabitation survey, from time zero until its end, for the presence of OsHV-1 infection. OsHV-1 DNA could not be detected in oyster tissues by real time PCR technique (33) in the batch of animals used here. These oysters were also found free of *V. aestuarianus* DNA at time zero using Taqman PCR assay (37).

The use of real time PCR in microbial diagnostics is a valuable alternative to time-consuming traditional methods such as classical bacteriological analysis based on the cultivability of organisms. Although based on the detection of DNA and not on the culture of live organisms, this molecular biology-based technique offers multiple advantages during surveys. Notably, its specificity and sensitivity allow the detection and quantification of low concentrations of epidemiologically significant microbial agents in aquatic animals and their environment (8-10, 32, 37). In the present study, a Taqman real time PCR was developed and evaluated to detect a mutated *V. splendidus* LGP32 strain tagged with GFP and known as pathogenic for *C. gigas* oyster by experimental injection. Utilizing this particular strain aimed at overcoming the risk of detection and quantification of other particular strains of avirulent *V. splendidus* constituent of the domestic flora of oysters (6, 38). Because *Vibrio* sp. constitute both a dominant genus amongst domestic bacterial flora of *C. gigas* oysters (30) and common inhabitants of estuarine coastal waters where animals are cultivated (42), a real time PCR technique using Sybr Green chemistry and adapted from Thompson *et al.* (43) was also used in the present study after being evaluated for its sensitivity and specificity.

Oysters are surrounded by waterborne microorganisms. To circumvent or at least minimize contamination during tissue sampling, hemolymph withdrawing was performed in the adductor muscle after removing seawater from the pallial cavity. As never reported before in the literature, all tested oysters were rapidly and heavily infected ($> 5 \times 10^3$ CFU ml⁻¹) with the challenged virulent *Vibrio* in the samples taken, hemolymph and various oyster organs, after just two hours of cohabitation. At this time an approximately ten fold increase of *Vibrio* population was also observed in the hemolymph of control animals coinciding with its slight increase in control tank water. Strong individual variations in bacterial load were also reported during the first 48 h post cohabitation challenge suggesting different susceptibility levels of oyster to vibriosis using this mode of infection that could be related in part with

the important genetic variability of this mollusk species (41). Nevertheless *V. aestuarianus* level of infection was reported as highly correlated ($p < 0.01$) to *V. splendidus* LGP32-GFP, strengthening the hypothesis of a possible collaboration between both strains as already highlighted by experimental injection challenges (38). Study of the dynamics of detection of *Vibrio* DNA in tanks water revealed that avirulent and virulent *Vibrio* were both transmitted horizontally *via* a waterborne mode of action probably facilitated by this mollusk species open circulatory system as well as its filtering feeding activity. As an underpinning observation, *Vibrio* bacterial loads found in hemolymph and in tank water of control oysters were correlated ($p < 0.01$). Noteworthy, after seven day and 19 days post 48 h cohabitation trial, no detectable levels of *V. splendidus* LGP32-GFP and *V. aestuarianus* DNAs respectively were found in the hemolymph of survivors, sustaining the hypothesis that oysters succeeded with their recovery from virulent *Vibrio* infection owing to their efficient defense mechanisms even if their presence in other tissues or organs may not be excluded. The contrasting level of *Vibrio* natural flora persisting at a level of $1 \cdot 10^4$ CFU ml⁻¹ during this 19 days survey despite the use of UV treated seawater, supports that oyster immune system might distinguish between harmful and harmless, potentially beneficial, *Vibrio* species. A qualitative characterization of this flora by classical bacteriological methods and metagenomics or by other molecular typing approaches will open new perspectives for a better comprehension of the mechanisms involved in defense reactions leading to either tolerance or destruction of invading bacteria (31, 36, 46).

In an attempt to characterize host-*Vibrio* interactions, a second aim for our study consisted in evaluating the kinetics of immune-related gene expression in the oyster *C. gigas* in response to harmful or harmless *Vibrio* sp. by using a non invasive experimental infection model aimed at reproducing horizontal transfer of vibriosis to healthy oysters. Concerning mollusk bivalves and *C. gigas* in particular, most of studies reported in the literature have used an immune stimulation based on a treatment by inactivated microorganisms, mainly *Micrococcus luteus*, *V. splendidus*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. tubiashii*, *V. metschnikovii* (11, 13, 25, 26), or microbial components such as lipopolysaccharides, poly I:C, poly G:C, dsDNA (13, 49) in the main purpose of confirming the involvement of newly identified putative immune genes in defense reactions and studying them at a transcriptional level. The same studies as well as others used live bacteria, mostly harmless, for instance *Micrococcus luteus*, *V. alginolyticus*, *V. tasmaniensis*, *V. anguillarum*, *V. splendidus*, *V. tubiashii*, *V. metschnikovii* (1, 14, 16, 26, 28, 44) but also virulent organisms, pathogenic for *C. gigas* such as *V. aestuarianus* (17). Nevertheless in this last instance, the lack of appropriate infection experimental model mimicking natural infection by microbial agents obliged the authors to directly inject the agents in soft tissues of animals and at high dose ($5 \cdot 10^7$ CFU oyster⁻¹). This approach remains problematic because the use of such an invasive mode of infection could have both short-circuited some probably important first line immune defenses or activation systems and disturbed normal host immune response against non desirable invaders. In this study live virulent

bacteria were used for the first time in a non invasive challenge method in a target bivalve mollusk species, here *C. gigas*. The same individual hemolymph samples used for *Vibrio* kinetics investigations were also used for RNA extractions, followed by reverse transcriptions and cDNA amplifications of four immune-related target genes and a housekeeping control gene, by real time PCR, using a constant initial volume of 600 μ l. This procedure allowed evaluating host response at transcriptional level. Concerning control animals, our data were found in agreement with those reported in the above studies. But in addition, an increase of *Vibrio* population found at time two hours in control animals coincided with a significant up-regulation of the four targeted genes i.e. *Cg*-BPI, *Cg*-SOD, *Cg*-I κ B and *Cg*-TIMP ($p < 0.001$) with expression values increases ranging from 6.6 to 78.4-fold depending on targeted gene. Nevertheless, contrarily to results reported in the literature and using mainly experimental injection with harmless live bacteria, this effect was transient since not observed after six hours post cohabitation. Conversely, despite the recorded individual response variability, all targeted transcripts tend in a later stage to be down regulated, after being normalized to *ef I* gene and gene expression quantification of a pool of RNA collected at time zero, just before the start of the cohabitation challenge. The use of virulent *Vibrio* species i.e. *V. splendidus* and *V. aestuarianus* caused a significant ($p < 0.001$) decrease of expression levels of all studied genes ranging from a 9.2 to 29-fold factor depending on genes and when compared to those of control animals, two hours post cohabitation. These results suggest that virulent *Vibrio* highly disturbed the immune response, which might be understood as a strategy of pathogenic *Vibrio*, aimed at enhancing their colonization skills into the *C. gigas* host. Nevertheless, this apparent immunodepression, occurring in less than six hours post cohabitation challenge, was short-term and no significant differences ($p > 0.05$) were observed comparing levels of each transcript in control and infected oysters at a same sampling time with the noticeable exception of *Cg*-I κ B gene at 48 h sampling time. The expression levels of none of the targeted genes were correlated to vibriosis resistance in this study. We expect that the original horizontal method developed and used here in a *C. gigas* host and aimed at mimicking natural mortality events induced by vibrios, will be in the next future a remarkable method for identifying new genes involved in disease resistance and virulence of *Vibrio*. This issue could also be achieved combining to this new non invasive infection method, other high-throughput methods such as microarrays, for analyzing simultaneously the expression profiles of multiple *C. gigas* and virulent bacterial genes made available by expressed sequenced tags approaches (4) and whole genome sequencing of pathogenic *Vibrio* species for oysters.

Acknowledgments

We thank N. Faury for providing the primers sequences used in this study to quantify of *C. gigas ef I* mRNA. LGP32-GFP was supplied by F. Le Roux to whom we are thankful. The authors are deeply

indebted to P. Haffner and N. Soussi for their technical support and to R.M. Le Deuff, C. François and Y. Reynaud for their kind help during rewriting of the manuscript.

References

1. **Bao, Y., L. Li, F. Xu, and G. Zhang.** 2009. Intracellular copper/zinc superoxide dismutase from bay scallop *Argopecten irradians*: Its gene structure, mRNA expression and recombinant protein. *Fish Shellfish Immunol.* **27**:210-220.
2. **Colwell, R. R., and J. Liston.** 1960. Microbiology of shellfish. Bacteriological study of the natural flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Appl. Microbiol.* **8**:104-109.
3. **De Decker, S., J. Normand, D. Saulnier, F. Pernet, S. Castagnet, and P. Boudry.** submitted for publication. Responses of diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* to *Vibrio* challenge in relation to their reproductive status. *J. Invertebr. Pathol.*
4. **Fleury, E., A. Huvet, C. Lelong, J. de Lorgeril, V. Boulo, Y. Gueguen, E. Bachere, A. Tanguy, D. Moraga, C. Fabioux, P. Lindeque, J. Shaw, R. Reinhardt, P. Prunet, G. Davey, S. Lapegue, C. Sauvage, C. Corporeau, J. Moal, F. Gavory, P. Wincker, F. Moreews, C. Klopp, M. Mathieu, P. Boudry, and P. Favrel.** 2009. Generation and analysis of a 29,745 unique Expressed Sequence Tags from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase. *BMC Genomics* **10**:341.
5. **Garnier, M., Y. Labreuche, C. Garcia, M. Robert, and J. L. Nicolas.** 2007. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microb. Ecol.* **53**:187-196.
6. **Gay, M., F. C. Berthe, and F. Le Roux.** 2004. Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.* **59**:49-56.
7. **Gay, M., T. Renault, A. M. Pons, and F. Le Roux.** 2004. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Dis. Aquat. Org.* **62**:65-74.
8. **Gilad, O., S. Yun, F. Zagnutt-Vergara, C. Leutenegger, H. Bercovier, and R. Hedrick.** 2004. Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio* koi as assessed by real-time TaqMan PCR. *Dis. Aquat. Org.* **60**:179-187.
9. **Goarant, C., and F. Merien.** 2006. Quantification of *Vibrio penaeicida*, the etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonian shrimp, by real-time PCR using SYBR Green I chemistry. *J. Microbiol. Methods* **67**:27.
10. **Goarant, C., Y. Reynaud, D. Ansquer, S. De Decker, and F. Merien.** 2007. Sequence polymorphism-based identification and quantification of *Vibrio nigripulchritudo* at the species and subspecies level targeting an emerging pathogen for cultured shrimp in New Caledonia. *J. Microbiol. Methods* **70**:30-38.
11. **Gonzalez, M., Y. Gueguen, D. Destoumieux-Garzon, B. Romestand, J. Fievet, M. Pugniere, F. Roquet, J.-M. Escoubas, F. Vandenbulcke, O. Levy, L. Saune, P. Bulet, and**

- E. Bachere.** 2007. Evidence of a bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the *Crassostrea gigas* Cg-BPI. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **144**:17759-17764.
12. **Gonzalez, M., B. Romestand, J. Fievet, A. Huvet, M.-C. Lebart, Y. Gueguen, and E. Bachère.** 2005. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. Biochem. Biophys. Res. Commun. **338**:1089-1097.
13. **Green, T. J., and A. C. Barnes.** 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.
14. **Gueguen, Y., J.-P. Cadoret, D. Flament, C. Barreau-Roumiguere, A.-L. Girardot, J. Garnier, A. Hoareau, E. Bachere, and J.-M. Escoubas.** 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. Gene **303**:139-145.
15. **Harris-Young, L., M. L. Tamplin, J. W. Mason, H. C. Aldrich, and J. K. Jackson.** 1995. Viability of *Vibrio vulnificus* in Association with Hemocytes of the American Oyster (*Crassostrea virginica*). Appl. Environ. Microbiol. **61**:52-57.
16. **Huvet, A., A. Herpin, L. Dégremont, Y. Labreuche, J.-F. Samain, and C. Cunningham.** 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.
17. **Labreuche, Y., C. Lambert, P. Soudant, V. Boulo, A. Huvet, and J. L. Nicolas.** 2006. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. Microbes Infect. **8**:2715-2724.
18. **Lacoste, A., F. Jalabert, S. Malham, A. Cueff, F. Gelebart, C. Cordevant, M. Lange, and S. A. Poulet.** 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. Org. **46**:139-145.
19. **Lallias, D., I. Arzul, S. Heurtebise, S. Ferrand, B. Chollet, M. Robert, A. R. Beaumont, P. Boudry, B. Morga, and S. Lapègue.** 2008. Bonamia ostreae-induced mortalities in one-year old European flat oysters *Ostrea edulis*: experimental infection by cohabitation challenge. Aquat. Living Resour. **21**:423-439.
20. **Le Deuff, R., J. L. Nicolas, T. Renault, and N. Cochenec.** 1994. Experimental transmission of herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol. **142**:69-72.
21. **Le Roux, F., M. Gay, C. Lambert, M. Waechter, S. Poubalanne, B. Chollet, J. L. Nicolas, and F. Berthe.** 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. Aquat. Living Resour. **15**:251-258.

22. **Livak, K. J., and T. D. Schmittgen.** 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**:402-408.
23. **Mateo, D. R., S. J. Greenwood, M. T. Araya, F. C. J. Berthe, G. R. Johnson, and A. Siah.** 2010. Differential gene expression of γ -actin, Toll-like receptor 2 (TLR-2) and interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK-4) in *Mya arenaria* haemocytes induced by *in vivo* infections with two *Vibrio splendidus* strains. *Dev. Comp. Immunol.* **34**:710.
24. **Miossec, L., R. Le Deuff, and P. Gouletquer.** 2009. Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). ICES Cooperative Research Report **299**:42.
25. **Mitta, G., F. Vandenbulcke, F. Hubert, and P. Roch.** 1999. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *J. Cell Sci.* **112**:4233-4242.
26. **Montagnani, C., J. C. Avarre, J. de Lorgeril, M. Quiquand, V. Boulo, and J. M. Escoubas.** 2007. First evidence of the activation of *Cg-timp*, an immune response component of Pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway. *Dev. Comp. Immunol.* **31**:1-11.
27. **Montagnani, C., Y. Labreuche, and J. M. Escoubas.** 2008. *Cg-IkB*, a new member of the $\text{I}\kappa\text{B}$ protein family characterized in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* **32**:182-190.
28. **Montagnani, C., F. Le Roux, F. Berthe, and J.-M. Escoubas.** 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 Letters* **500**:64-70.
29. **Murchelano, R. A., and J. L. Bishop.** 1969. Bacteriological study of laboratory-reared juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Invertebr. Pathol.* **14**:321.
30. **Olafsen, J. A., H. V. Mikkelsen, H. M. Giæver, and G. Høvik Hansen.** 1993. Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1848-1854.
31. **Pamer, E. G.** 2007. Immune responses to commensal and environmental microbes. *Nat Immunol* **8**:1173.
32. **Pang, L., X. H. Zhang, Y. Zhong, J. Chen, Y. Li, and B. Austin.** 2006. Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the *toxR* gene. *Lett. Appl. Microbiol.* **43**:249-255.
33. **Pépin, J. F., A. Riou, and T. Renault.** 2008. Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *J. Virol. Methods* **149**:269-276.
34. **Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* **29**:e45-.
35. **Pruzzo, C., G. Gallo, and L. Canesi.** 2005. Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environ Microbiol* **7**:761-772.

36. **Sansonetti, P. J., and R. Medzhitov.** 2009. Learning Tolerance while Fighting Ignorance. *Cell* **138**:416-420.
37. **Saulnier, D., S. De Decker, and P. Haffner.** 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.
38. **Saulnier, D., S. De Decker, P. Haffner, L. Cobret, M. Robert, and C. Garcia.** 2010. A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. *Microb. Ecol.* **59**:787-798.
39. **Schott, E. J., J. A. Fernandez-Robledo, M. R. Alavi, and G. R. Vasta.** 2008. Susceptibility of *Crassostrea ariakensis* (Fujita 1913) to *Bonamia* and *Perkinsus* spp. infections: Potential for disease transmission between Oyster species. *J. Shellfish Res.* **27**:541-549.
40. **Taris, N., R. Lang, and M. Camara.** 2008. Sequence polymorphism can produce serious artefacts in real-time PCR assays: hard lessons from Pacific oysters. *BMC Genomics* **9**:234.
41. **Taris, N., C. Sauvage, F. M. Batista, S. Baron, B. Ernande, P. Haffray, and P. Boudry.** 2006. Conséquences génétiques de la production de larves d'huîtres en éclosérie: étude des processus de dérive et de sélection. *Les Actes du BRG* **6**:521-541.
42. **Thompson, J. R., S. Pacocha, C. Pharino, V. Klepac-Ceraj, D. E. Hunt, J. Benoit, R. Sarma-Rupavtarm, D. L. Distel, and M. F. Polz.** 2005. Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population. *Science* **307**:1311-1313.
43. **Thompson, J. R., M. A. Randa, L. A. Marcelino, A. Tomita-Mitchell, E. Lim, and M. F. Polz.** 2004. Diversity and dynamics of a north atlantic coastal *Vibrio* community. *Appl Environ Microbiol* **70**:4103-4110.
44. **Tirape, A., C. Bacque, R. Brizard, F. Vandenbulcke, and V. Boulo.** 2007. Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Dev. Comp. Immunol.* **31**:859-873.
45. **Travers, M.-A., O. Basuyaux, N. Le Goic, S. Huchette, J.-L. Nicolas, M. Koken, and C. Paillard.** 2008. Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Glob. Chang. Biol.* **15**:1365-1376.
46. **Vance, R. E., R. R. Isberg, and D. A. Portnoy.** 2009. Patterns of Pathogenesis: Discrimination of Pathogenic and Nonpathogenic Microbes by the Innate Immune System. *Cell Host & Microbe* **6**:10-21.
47. **Virgin, H. W. S.** 2007. *In vivo* veritas: pathogenesis of infection as it actually happens. *Nat Immunol* **8**:1143.

48. **Waechter, M., F. Le Roux, J. L. Nicolas, E. Marissal, and F. Berthe.** 2002. Characterization of pathogenic bacteria of the cupped oyster *Crassostrea gigas*. *C. R. Biologies* **325**:231-238.
49. **Zhang, D., S. Jiang, L. Qiu, T. Su, K. Wu, Y. Li, C. Zhu, and X. Xu.** 2009. Molecular characterization and expression analysis of the IκB gene from pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Shellfish Immunol.* **26**:84-90.

Discussion et perspectives

1. Transmission des *Vibrio* pathogènes et commensaux et prise en charge différentielle de ces deux types de bactéries par l'huître

Peu de travaux concernant les mollusques rapportent l'utilisation de protocoles d'infection expérimentale utilisant une voie non invasive (Le Deuff, *et al.*, 1994; Gay, *et al.*, 2004a; Lallias, *et al.*, 2008; Schott, *et al.*, 2008; Travers, *et al.*, 2008). En particulier, aucun n'avait été développé à notre connaissance, pour des objectifs de description d'une dynamique d'infection dans le temps et d'exploration d'interactions entre des *Vibrio* pathogènes et *C. gigas*. Quatre expérimentations préliminaires de cohabitation ont permis l'optimisation de cette procédure qui permet d'explorer les transferts horizontaux de *Vibrio* entre animaux malades et animaux sains et leur conséquence chez l'hôte, dans des conditions cherchant à mimer celles prévalant dans le milieu naturel. L'ensemble des prélèvements d'hémolymphe a été effectué chez des animaux vivants, ne présentant aucun signe de faiblesse musculaire.

De plus, ce protocole d'infection expérimentale a été combiné à des outils de PCR en temps réel développés pour les objectifs spécifiques de description de la pathogénèse. Le premier outil cible spécifiquement le gène de la GFP de la souche mutante *V. splendidus* LGP32-GFP et permet de distinguer la souche virulente utilisée des éventuelles autres souches non virulentes appartenant au groupe polyphylétique de *V. splendidus* et naturellement présentes au sein de la flore endogène de l'huître ; le deuxième outil de PCR en temps réel vise à permettre une quantification de la flore vibronacée totale puisque la littérature scientifique rapporte que c'est le genre dominant constitutif de la flore endogène de l'huître creuse (Olafsen, *et al.*, 1993) et des écosystèmes estuariens (Thompson, *et al.*, 2005), comme évoqué plus haut.

Au vu de résultats rapportant l'implication dominante de l'herpès virus OsHV-1 et de *V. aestuarianus* dans les épisodes de mortalité estivale (Miossec, *et al.*, 2009b) et de nos travaux antérieurs faisant état de l'influence d'un portage asymptomatique en *V. aestuarianus* et en herpès virus sur la sensibilité des huîtres (cf. chapitre 2), les huîtres utilisées dans cette étude ont été diagnostiquées au préalable vis-à-vis de ces deux agents infectieux: elles présentaient un portage nul ou du moins inférieur au seuil de détection offert par les techniques diagnostiques. De plus une recherche d'ADN d'OsHV-1 dans les échantillons d'hémolymphe prélevés à tous les temps fixés, a systématiquement confirmé un portage nul. Par ailleurs, aucune mortalité n'a été observée dans la condition contrôle alors que 27% de mortalité cumulée ont été induits 16 jours après le début de la cohabitation des huîtres sentinelles avec celles expérimentalement infectées par *V. splendidus* LGP32-GFP et *V. aestuarianus*. Les analyses bactériologiques classiques, basées sur la cultivabilité des

souches, et réalisées sur les animaux récemment morts ont permis de confirmer l'infection par ces deux agents pathogènes.

Ainsi, cette expérimentation de cohabitation a mis en évidence des phénomènes de transmission horizontale entre individus malades et individus sains après seulement deux heures de cohabitation, confirmant le pouvoir infectieux de ces deux bactéries virulentes. De plus, leur détection dans différents tissus analysés à ce même temps de la cinétique souligne leur pouvoir invasif. L'ensemble des mesures ayant été réalisé au niveau individuel, une grande variabilité inter-individuelle a été mise en évidence suggérant des niveaux de sensibilité aux vibrioses contrastés, qui pourraient être reliés à la variabilité génétique importante démontrée chez *C. gigas* (Taris, *et al.*, 2006b). Néanmoins, la mise en évidence d'une corrélation positive ($p < 0.01$) entre les charges individuelles de *V. splendidus* et *V. aestuarianus* renforce l'hypothèse de l'existence d'une collaboration entre ces deux *Vibrio* pathogènes, évoquée au cours de travaux précédents (Saulnier, *et al.*, 2010), même si une dominance quantitative de *V. aestuarianus* par rapport à *V. splendidus* (de l'ordre d'un facteur 10) est systématiquement observée dans la totalité des échantillons analysés.

Après 7 jours et 19 jours post-cohabitation (la cohabitation proprement dite ayant été limitée volontairement à 48h), l'ensemble des hémolymphes prélevées chez les animaux vivants semble être débarrassé respectivement de *V. splendidus* et *V. aestuarianus*, suggérant la mise en oeuvre de mécanismes de défense efficaces aboutissant à une probable guérison de ces animaux. Cette hypothèse est étayée par l'observation d'une flore vibrionacée maintenue dans l'eau ou dans l'hémolymphe à des niveaux élevés tout au long des 19 jours de suivi ($> 10^4$ UFC/mL) malgré l'utilisation d'eau de mer traitée aux UV: cette persistance suggère la capacité du système de défense de l'huître à distinguer les *Vibrio* pathogènes des *Vibrio* probablement bénéfiques pour sa santé. Par ailleurs, l'analyse des dynamiques de détection des *Vibrio* pathogènes ou commensaux dans l'eau des bacs a révélé une transmission horizontale active de ces bactéries, qu'elles soient pathogènes ou non, *via* l'eau de mer des bacs. Cette transmission horizontale est probablement facilitée par l'activité de filtration et le système semi-ouvert des huîtres. D'ailleurs une corrélation positive ($p < 0.01$) a été observée entre les charges en flore vibrionacée totale quantifiée dans les hémolymphes et l'eau des bacs soulignant l'existence d'un équilibre dynamique entre ces deux compartiments, eau et hémolymphe.

L'ensemble de ces résultats incite vivement à l'élaboration de projets visant la caractérisation qualitative de cette flore et de son évolution par diverses approches bactériologiques et métagénomiques pour une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le maintien de la flore commensal, dans l'élimination des bactéries pathogènes et des réactions de défense différentielles conduisant soit à l'induction d'une tolérance soit à la destruction des bactéries endogènes indésirables (Harris-Young, *et al.*, 1995; Pamer, 2007; Virgin, 2007; Nyholm, *et al.*, 2009; Sansonetti et Medzhitov, 2009; Vance, *et al.*, 2009).

2. Sous-expression des 4 gènes hémoctaires induite par les *Vibrio* pathogènes après 2h de cohabitation

La plupart des études visant à identifier puis à démontrer le rôle des gènes impliqués dans l'immunité des bivalves et particulièrement chez *C. gigas*, s'attache à décrire la réponse de l'hôte après une stimulation du système immunitaire par des microorganismes inactivés, tels que *Micrococcus luteus*, *V. splendidus*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. tubiashii*, *V. metschnikovii* (Mitta, *et al.*, 1999; Gonzalez, *et al.*, 2007c; Montagnani, *et al.*, 2007b; Green et Barnes, 2009), ou encore de composés bactériens ou viraux tels les lipopolysaccharides, poly I:C, poly G:C, ADN (Green et Barnes, 2009; Zhang, *et al.*, 2009). Néanmoins il est notable que certaines de ces espèces bactériennes n'ont jamais été retrouvées dans le milieu marin, tel *V. metschnikovii*, pathogène de poulet. D'autres études décrivent la réponse au niveau transcriptionnel de l'hôte après injection de bactéries vivantes non pathogènes, comme *Micrococcus luteus*, *V. alginolyticus*, *V. tasmaniensis*, *V. anguillarum*, *V. splendidus*, *V. tubiashii*, *V. metschnikovii* (Montagnani, *et al.*, 2001; Gueguen, *et al.*, 2003; Huvet, *et al.*, 2004; Montagnani, *et al.*, 2007b; Tirape, *et al.*, 2007; Bao, *et al.*, 2009) ou pathogènes pour *C. gigas* comme *V. aestuarianus* (Labreuche, *et al.*, 2006a). Cependant, contrairement à la cohabitation, l'injection de ces bactéries dans les tissus de l'hôte court-circuite les premières lignes de défense de l'hôte, physique ou moléculaire, et favorise probablement l'entrée de bactéries non désirées au niveau de la blessure provoquée par la piqûre tout en perturbant également la réponse de l'hôte.

Les surexpressions des 4 gènes ciblés (par rapport à un T0), potentiellement impliqués dans les mécanismes de réparation tissulaire, de reconnaissance et d'élimination de bactéries pathogènes, observés chez les individus sentinelles contrôles après 2h de cohabitation, corroborent les données rapportées dans les travaux précédemment cités. Ces surexpressions significatives ($p < 0.0001$) coïncident avec une augmentation de la flore vibrionacée totale quantifiée chez ces mêmes individus contrôles. Cependant, ces surexpressions quasi immédiates, apparaissent transitoires puisque l'ensemble des transcrits analysés aux temps ultérieurs, 6h, 24h et 48h, tendent vers des niveaux de sous-expression.

Concernant les huîtres sentinelles testées en présence des deux bactéries pathogènes, *V. splendidus* et *V. aestuarianus*, une diminution significative ($p < 0.001$) des niveaux d'expression est observée pour l'ensemble des 4 gènes analysés après 2h de cohabitation, par rapport à ceux obtenus chez les individus contrôles. Ce résultat suggère que ces *Vibrio* pathogènes perturbent de façon appréciable la réponse de l'hôte, ce qui peut être traduit comme une stratégie de virulence favorisant leur capacité de colonisation dans les tissus de l'hôte. Néanmoins, ce phénomène apparentée à une immunodépression probable reste transitoire puisqu'aucune différence de niveaux de transcrits

($p > 0.05$) n'est observée aux temps ultérieurs entre les individus contrôles et les individus infectés. L'implication de ces quatre gènes dans les mécanismes de résistance des huîtres à des vibrioses expérimentales utilisant un mode non invasif mériterait d'être éclaircie. Enfin, l'ensemble de ces analyses ayant été réalisés sur des échantillons d'hémolymphe, il convient de noter qu'on ne peut exclure une éventuelle mobilisation des cellules de défense dans d'autres tissus que l'hémolymphe. De plus, même si on observe une chute des niveaux de transcrits dans la condition infectée par rapport à la condition contrôle, la production de protéines effectrices de l'immunité est peut-être suffisante dans ces conditions expérimentales pour conférer à l'animal une résistance à cette vibriose. Ces hypothèses mériteraient des études complémentaires.

3. Le modèle de cohabitation : un outil d'évaluation et de comparaison des différentiels de réponses des huîtres à une vibriose expérimentale

Malgré les contraintes techniques liées aux caractéristiques de l'huître empêchant tout prélèvement d'hémolymphe non destructif et ne laissant alors pour seul recours expérimental que l'augmentation des effectifs analysés pour la réalisation d'un suivi de pathogénèse, ce modèle *in vivo* de cohabitation présente cependant des avantages méthodologiques certains ouvrant des perspectives d'expérimentations attirantes. D'une part, les voies d'entrée naturelles des *Vibrio* pathogènes pourraient être caractérisés en focalisant les échantillonnages sur des durées très courtes de cohabitation (< 2h). Ces outils de cohabitation et de quantification par PCR en temps réel permettraient également d'établir une cartographie spatio-temporelle des dynamiques d'infection dans différents tissus de l'huître, et pourraient être couplés à des techniques d'hybridation *in situ* pour une localisation tissulaire des agents infectieux ou à l'utilisation de protocoles d'immuno-histologie, tel que celui qui a été développé pour la localisation spécifique de *V. splendidus* LGP32-GFP (cf. article 3).

L'analyse de l'expression d'autres gènes impliqués dans les mécanismes de défense, combinée à une analyse des profils d'expression de gènes de virulence des *Vibrio*, comme la métalloprotéase ou des protéines impliquées dans le quorum sensing, et à la détection spécifique dans différents tissus de protéines de virulence, permettrait de mieux comprendre la pathogénèse induite par ces vibriens virulents. Les données disponibles issues des banques EST (Fleury, *et al.*, 2009a) ou des séquençages complets des *Vibrio* pathogènes (numéro d'accession GeneBank de la souche *V. splendidus* : LGP32NC_011753, NC_011744 et séquençage complet de la souche *V. aestuarianus* 02/041 dans le cadre du programme Genoscope) faciliteraient l'identification de gènes dont l'expression serait associée à une capacité accrue des huîtres à juguler une infection de type vibriose. Ces gènes identifiés pourraient être destinés à l'élaboration de programme de sélection génétique dirigée.

Des expérimentations similaires de pathogenèse pourraient enfin être menées dans le but de caractériser les mécanismes conduisant à une spécificité des réponses de l'huître visant l'élimination des *Vibrio* pathogènes et le maintien d'une flore endogène commensale dont il serait intéressant de définir par ailleurs les bénéfices pour l'hôte. L'analyse des contrastes des réponses des huîtres à une cohabitation avec l'un ou l'autre des deux *Vibrio* pathogènes permettrait également d'explorer cette probable collaboration liant *V. splendidus* et *V. aestuarianus*. Enfin, des approches similaires pourraient être conduites en présence des vibrions pathogènes et de l'herpès virus OsHV-1 afin d'approfondir les connaissances sur la pathogenèse de ces deux types d'agents infectieux.

DISCUSSION GENERALE

ET PERSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Rappels des principaux résultats

Cette thèse visait une meilleure compréhension des interactions entre l'huître creuse *Crassostrea gigas* et les *Vibrio* pathogènes, *V. splendidus* et *V. aestuarianus*, fréquemment associés à des épisodes de mortalités estivales. L'ensemble de ces travaux a permis :

- de démontrer la prédominance épidémiologique de ces deux espèces de *Vibrio* dans les phénomènes de mortalités estivales d'huître creuse observés entre 2003 et 2007,
- de souligner le rôle de l'activité métalloprotéasique comme un marqueur de virulence phénotypique commun aux souches bactériennes pathogènes associées à ces épisodes de mortalité,
- de mettre en évidence un effet synergique dans la pathogénicité des deux souches *V. splendidus* LGP32 et *V. aestuarianus* 02/041 lorsqu'elles sont injectées en co-infection expérimentale,
- de documenter ce phénomène de synergie par la mise en évidence *in vitro* d'un mécanisme de quorum sensing modulant aux échelles intra- et interspécifique la production et l'expression au niveau transcriptionnel du gène codant la métalloprotéase chez les deux *Vibrio* étudiés,
- de corrélérer, grâce à un protocole de co-injection expérimentale reproductible, la variabilité physiologique (gamétogenèse) et génétique de l'huître à sa sensibilité aux vibrioses expérimentales,
- de décrire, grâce à un protocole de cohabitation expérimentale, les dynamiques d'infection de ces deux *Vibrio* pathogènes dans l'hémolymphe de l'huître révélant l'existence d'une transmission horizontale rapide d'individus infectés à des individus sains et un fort pouvoir invasif de ces deux agents infectieux dans l'hôte,
- de caractériser des liens étroits entre les hémocytes et les *Vibrio* pathogènes, *in vitro* mais également *in vivo* par l'observation de l'induction par les *Vibrio* d'une sous-expression précoce de plusieurs gènes de défense immunitaire ciblés,
- d'illustrer l'importance de la flore bactérienne endogène de l'hémolymphe dans la modulation des réponses de l'huître à une vibriose expérimentale.

Facteurs de l'huître déterminant leur sensibilité à une vibriose

L'ensemble de ces résultats rend compte de multiples phénomènes mis en jeu, de systèmes d'équilibres fragiles, de potentielles collaborations et compétitions, expliquant la variabilité de sensibilité de l'huître creuse aux vibrioses. Ces capacités différentielles de réponse de l'huître à une vibriose expérimentale, au niveau cellulaire, individuel ou populationnel, expliqueraient probablement, au moins pour partie, la variabilité d'intensité des mortalités estivales observées *in situ*. Le schéma ci-dessous (Figure 49) propose une synthèse des interactions multiples qui seraient observables *in situ*, entre une population d'huîtres creuses et des bactéries du genre *Vibrio*. Il rend compte de différents facteurs affectant la fonction de survie de l'huître dans un environnement donné. Il est cependant nécessaire de souligner que la qualification de l'environnement, en périodes « favorable » ou « défavorable » proposée au regard de cette fonction de survie, n'est pas adaptée à la fonction de croissance optimisée dans un environnement « estival » (température favorable à la croissance et abondance du phytoplancton). Ainsi, l'huître creuse, au cours d'une année, est soumise à deux types d'environnements d'élevage :

- le premier environnement apparaît « favorable » à l'huître et peu favorable aux *Vibrio* sp. ;
- le deuxième environnement serait plus contraignant pour l'huître mais très favorable aux *Vibrio* sp. (Figure 49).

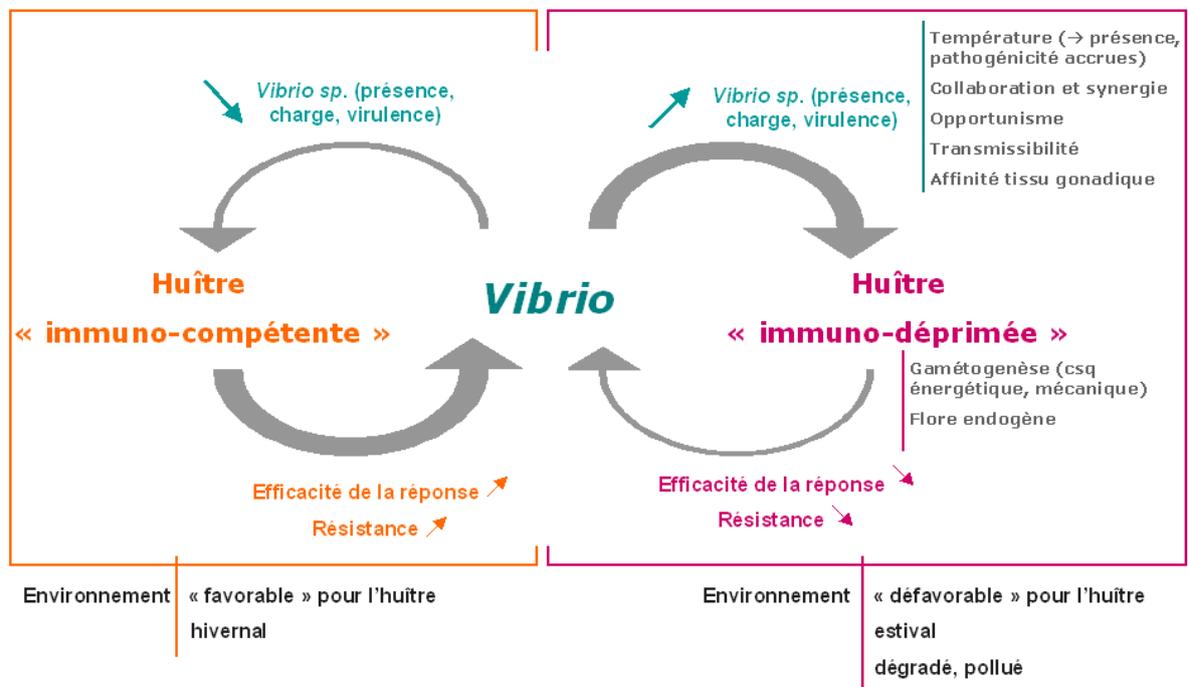


Figure 49 : Schéma représentant différentes interactions reliant une « population » d'huîtres et ses capacités de défense et des bactéries pathogènes du genre *Vibrio*, et leurs implications différentielles dans deux types d'environnements contrastés. L'épaisseur des flèches grises traduit l'efficacité d'action entre les compartiments hôte et *Vibrio*.

Les deux types de boucles d'interaction figurée ci-dessus représentent la variabilité des situations et des interactions *Vibrio*-huîtres, dont les fonctions physiologiques et immunitaires sont intimement contrôlées par les paramètres environnementaux, auxquels sont directement exposées les huîtres. La plasticité phénotypique variable de l'huître vis-à-vis des *Vibrio* pathogènes, observée aux niveaux inter-individuel ou inter-populationnel, est par ailleurs déterminée par des facteurs génétiques en interaction également avec l'environnement (Ernande, *et al.*, 2004).

La disponibilité de nombreuses informations de séquences identifiées chez l'huître creuse (banque EST) (Fleury, *et al.*, 2009a) et chez les *Vibrio* pathogènes par séquençage complet des génomes (Le Roux, *et al.*, 2009) permet aujourd'hui la mise au point de nouveaux outils haut débit d'analyse de transcriptomes, tels des puces à ADN (microarray), déjà utilisées chez *C. gigas* ou chez différents modèles (Dimopoulos, *et al.*, 2002; Fleury, *et al.*, 2009b). Grâce à l'analyse simultanée de l'expression de milliers de gènes de l'hôte et de gènes bactériens, cet outil permettrait l'identification de gènes candidats impliqués dans les mécanismes de résistance aux vibrioses des populations d'huîtres issues d'environnements variés, et l'identification de gènes de virulence des vibrions. Ainsi l'exploration de nouvelles interactions hôte-*Vibrio* (Casadevall et Pirofski, 2001; Cornelis et Rappuoli, 2001; Wenne, *et al.*, 2007) et les possibilités de sélection génétique d'huîtres résistantes aux vibrioses s'en trouveraient facilitées.

Les mortalités estivales : un phénomène multi-étiologique

Les études portant sur l'analyse épidémiologique de maladies infectieuses tendent généralement à rechercher un agent pathogène responsable et à caractériser la réponse de l'hôte à une unique source pathogène. Les approches développées récemment en patho-immuno-écologie rendent de plus en plus compte de l'importance de considérer certains phénomènes pathologiques dans un contexte dynamique d'évolution et d'écologie (Rolff et Siva-Jothy, 2003). Ceci apparaît d'autant plus important que les huîtres sont directement soumises à des paramètres environnementaux biotiques ou abiotiques variables. De plus, les huîtres présentent un système de circulation semi-ouvert qui les expose directement à des microorganismes divers et potentiellement pathogènes, les obligeant à développer un système de maintien de l'équilibre entre l'environnement extérieur et leur milieu interne. Enfin, dotées d'un système de défense inné, dépourvu de mémoire immunitaire, les huîtres semblent incapables de développer des mécanismes de résistance spécifiques vis-à-vis d'un agent infectieux auquel elles auraient été confrontées précédemment.

Au vu de i. l'implication récurrente de *V. splendidus*, *V. aestuarianus*, et de l'herpès virus OsHV-1, ii. des co-détections observées de *Vibrio* et d'herpès virus OsHV-1 (cf. chapitre 2), iii. du caractère infectieux de ces phénomènes dont l'impact revêt un caractère de plus en plus inquiétant et iv. du fait qu'il n'a été identifié aucun agent pathogène pouvant expliquer de façon systématique ces mortalités massives, il apparaît donc judicieux de considérer ces mortalités comme la résultante de phénomènes multi-étiologiques, bactériens et viraux : une diversité d'espèces bactériennes opportunistes et virales, profitant de conditions environnementales favorables et de la fragilité physiologique des animaux en période estivale, seraient impliquée dans ces phénomènes. Les récents résultats portant sur l'effet d'un traitement antibiotique sur l'expression de mortalité observée en 2010 sur un site du Bassin de Marennes-Oléron (cf. annexe 3) démontrent clairement l'implication de bactéries dans ces épisodes de mortalités, même si ces résultats ne peuvent exclure l'implication d'un autre type d'agent infectieux.

Par ailleurs, l'hypothèse de l'existence d'un agent pathogène non détecté car non cultivable ou non dominant sur milieu synthétique ne peut être à l'heure actuelle écartée ; dans un tel scénario, les bactéries dominantes cultivables qui ont été étudiées dans ces travaux seraient strictement opportunistes et pourraient être considérées comme des agents pathogènes dits « secondaires » (favorisant l'infection de l'agent causal hypothétique non identifié à ce jour, ou profitant de la détresse physiologique des animaux infectés par ce dernier). L'étude de ces phénomènes complexes, impliquant vraisemblablement plusieurs agents pathogènes, viraux et/ou bactériens, ne peut se faire sans être accompagnée d'une approche holistique d'écologie incluant l'étude *in situ* des populations microbiennes, de la biologie de l'huître et des paramètres environnementaux.

Dans la mesure où le ou les agent(s) pathogène(s) serai(en)t présent(s) sur des sites de culture localisés dans un milieu ouvert dans lequel on retrouve également des populations sauvages d'huîtres, l'éradication de(s) l'agent(s) pathogène(s) n'est pas envisageable. Seules des mesures visant la diminution de la gravité de la maladie en atténuant les facteurs de risques semblent être adaptées. C'est dans ces objectifs qu'il apparaît donc primordial de développer de nouvelles approches d'épidémiologie concentrées sur les échelles intra-hôte (individu, dynamique d'infection) et inter-hôte (population, dynamique de transmission) (Murray, 2008), comme cela a déjà été réalisé avec succès chez d'autres modèles (Horowitz et Horowitz, 2001; Lotz, *et al.*, 2001; Flye Sainte Marie, 2007). Les apports de la modélisation en épidémiologie constituent une véritable aide à la compréhension des phénomènes complexes et à l'optimisation de plans expérimentaux. L'infection est un phénomène fonction du temps, dont il serait important de définir les paramètres afin d'adapter les stratégies d'échantillonnages aux cinétiques d'infection associées (Gómez-Díaz, 2009). Les résultats présentés dans l'article 4 pourraient être mis à profit et approfondis pour l'élaboration de modèles d'épidémiologie statistique (*in situ*) ou dynamique (expérimentale). L'intégration de différents facteurs de risques, des caractéristiques phénotypiques variables des populations concernées,

permettraient une meilleure compréhension de la variabilité d'intensité de ces phénomènes de mortalités et ouvriraient des suggestions de mesures de prévention, de gestion et d'aide à la décision (Murray et Peeler, 2005; Murray, 2008).

Par ailleurs, l'ensemble des travaux menés au cours de cette thèse est basé sur l'utilisation de deux souches de *Vibrio* dont le pouvoir pathogène avait été démontré en infection expérimentale : *V. splendidus* LGP32 et *V. aestuarianus* 02/041. Ces deux souches étaient associées à des épisodes de mortalité datant aujourd'hui d'une dizaine d'années. Les travaux présentés dans l'article 1 rendent compte de l'existence de souches plus ou moins pathogènes isolées dans des contextes plus récents. Des études d'épidémiologie moléculaire comparative de différentes souches isolées dans différents contextes de mortalité (années, origines des animaux, zones géographiques,...) permettraient d'approfondir nos connaissances sur les supports moléculaires de la virulence de ces souches et de fournir des outils de suivis spatio-temporels de ces souches. Les génomes de *Vibrio* présentant une plasticité importante, l'hypothèse d'une virulence accrue de *Vibrio* associés aux mortalités estivales peut être envisagée : il conviendrait alors d'essayer d'identifier la source de virulence accrue par comparaison de souches anciennes avec des souches récemment isolées. De même, il serait intéressant d'avoir ce même type d'approche appliquée à des souches isolées en co-détection avec l'herpès virus comparées à des souches non associées à la présence de cet agent viral. Des outils récents basés sur l'analyse de carte optique constituent aujourd'hui une méthode rapide d'identification de zones de divergence entre deux génomes, qui permet de s'affranchir des méthodes plus lourdes de génomiques comparatives (Latreille, *et al.*, 2007; Kotewicz, *et al.*, 2008; Barrangou, *et al.*, 2009).

Enfin, au vu de ces observations, des caractéristiques propres à l'environnement d'élevage de l'huître creuse et de la variabilité du phénotype de survie de l'huître, la sélection d'animaux présentant une résistance accrue à ce(s) agent(s) pathogène(s) reste une stratégie d'intérêt s'inscrivant à plus ou moins long terme. Les éléments présentés illustrant une base génétique de la résistance aux vibrioses et la validation d'outils d'infection expérimentale permettent aujourd'hui d'envisager le développement de programmes de sélection d'animaux présentant des valeurs supérieures pour ce caractère de résistance à un ou plusieurs agents infectieux. L'amélioration génétique des performances de survie des huîtres creuses soumises à des infections multiples, bactériennes et virales, impliquera l'évaluation de l'héritabilité de ce caractère d'une part et la validation de cette amélioration dans le milieu naturel. Compte tenu du caractère infectieux de ces phénomènes de mortalités, des alternatives prophylactiques à court terme pourraient être testées et évaluées en terme de faisabilité économique et technique : une délocalisation des structures d'élevage i. vers des milieux plus vierges, sous une influence anthropique moindre, et dans lesquels les paramètres de transmission des agents infectieux pourraient être réduits, comme la pleine mer sur des filières profondes à faible densité ou, ii. vers des

milieux plus protégés, maîtrisables (assec, décontamination) et contrôlables (proximité), comme les claires ostréicoles.

La pathologie expérimentale : atouts et contraintes dans le cadre des études d'interactions huître-*Vibrio*

La plupart de ces travaux ont été réalisés par le biais d'outils d'infection expérimentale dont les modalités étaient ajustées aux objectifs. Ces protocoles combinés à divers outils de détection et de quantification spécifiques des pathogènes permettaient des approches intégrées pour la caractérisation de l'hôte, des *Vibrio* et de leurs interactions. En effet, ces approches nous ont permis de documenter la variabilité du phénotype « résistance » - ou « sensibilité » - de l'huître et de la corrélérer à différents facteurs de l'hôte. La qualité des modèles d'infection expérimentale réside principalement dans le choix ou la sélection des animaux utilisés pour les expérimentations. Aucune population d'huîtres présentant les caractères « d'animaux de laboratoire » (comme des lignées gynogénétiques) n'étant disponible à ce jour, l'ensemble des infections expérimentales ont impliqué différentes mesures visant la « standardisation » des animaux : protocole d'acclimatation permettant de « normaliser » au mieux les caractères physiologiques des animaux, utilisation de lignées consanguines. De plus, aucun descripteur prédictif de santé n'étant disponible, il convenait de réaliser systématiquement des analyses diagnostiques des principaux agents infectieux connus sur les lots d'animaux destinés aux expérimentations.

Par ailleurs, contrairement à d'autres modèles animaux tels que les poissons ou les crustacés chez qui plusieurs prises de sang ou biopsies sont réalisables chez un même individu, il n'existe pas à l'heure actuelle de protocole de prélèvements de tissus d'huître répétés qui n'altérerait pas la mesure faite sur l'échantillon. Les volumes d'hémolymphe prélevés par individu, l'altération tissulaire et la voie d'entrée engendrées par la ponction ne sont vraisemblablement pas sans conséquence sur les paramètres physiologiques étudiés. En effet aucun phénomène de cicatrisation n'est décrit. De plus, aucun signe clinique spécifique d'une vibriose n'est décrit à ce jour : seule l'observation d'une faiblesse musculaire semble témoigner d'une fragilité physiologique globale de l'huître à un moment donné, mais n'apparaît pas irrémédiable. Cette faible réactivité musculaire peut constituer un symptôme alertant un processus pathologique en cours et motivant ainsi le recours à des analyses diagnostiques. Ainsi, les analyses individuelles de pathogenèse peuvent difficilement s'affranchir d'un échantillonnage destructif. Par ailleurs, une grande variabilité individuelle dans les niveaux d'infection est observée chez les individus infectés, suggérant que seuls quelques individus présentant des charges importantes pouvaient avoir un effet important sur la dynamique des phénomènes observés. Ceci

implique la réalisation des analyses au niveau individuel sur des effectifs importants, ce qui alourdit significativement les plans expérimentaux.

Cependant, les performances de ces approches expérimentales utilisées dans le cadre de cette thèse pour des objectifs « écologiques » ouvrent des perspectives prometteuses visant l'explication des contrastes des réponses d'un point de vue plus « mécanistique ». De tels outils peuvent également servir d'outils de sélection d'animaux présentant des profils contrastés en réponse à une vibriose expérimentale. Afin d'expliquer la variabilité de la capacité de résistance de l'huître à une vibriose expérimentale, des études de pathogenèse pourraient également être réalisées sur des familles présentant des différentiels de survies à une vibriose expérimentale et permettraient d'identifier les caractéristiques des dynamiques d'infection ou des réponses de l'hôte conduisant ou non à la mort de l'animal. Ces perspectives sont évidemment conditionnées par la disponibilité de familles d'huîtres caractérisées et contrastées.

Enfin, ces outils d'infection expérimentale appliquée à l'huître nous ont permis de mettre en évidence l'influence de la flore endogène hémolymphatique dans l'équilibre physiologique de l'huître. Cette caractéristique d'importance ouvre des perspectives d'intérêt sur l'écologie des microorganismes hébergés par l'hôte.

Les approches de métagénomique et de métatranscriptomique pour la caractérisation de la flore endogène de l'huître et son implication dans les mécanismes de défense

Les microorganismes, champignons unicellulaires, bactéries et virus, représenteraient 60% de la biomasse présente sur Terre (Singh, *et al.*, 2009), constituant dès lors les formes de vie terrestres les plus abondantes. On estime entre 10^7 et 10^9 le nombre d'espèces bactériennes, colonisant vraisemblablement la quasi-totalité des écosystèmes. Depuis des milliers d'années, ces bactéries entretiennent des associations complexes et évolutives avec leurs hôtes (parasitisme, mutualisme et commensalisme) (Harvell, 2004). En effet, de nombreuses bactéries co-habitent dans différents tissus de l'hôte et leurs rôles primordiaux dans diverses fonctions physiologiques amènent à considérer ce microbiote comme un véritable organe (Dethlefsen, *et al.*, 2007). Chez les invertébrés, de récentes études portant sur le rôle de ce microbiote corroborent l'hypothèse aujourd'hui unanime d'une implication significative de cette flore dans l'immunité de ces organismes (Harris-Young, *et al.*, 1995; Pruzzo, *et al.*, 2005; Virgin, 2007; Haine, 2008; Nyholm, *et al.*, 2009). Les nombreuses études portant sur les phénomènes de blanchissement du corail peuvent être sources d'inspiration. En effet, depuis quelques décennies, les phénomènes de blanchissement du corail se sont considérablement accrus

(Harvell, *et al.*, 1999; Rosenberg et Ben-Haim, 2002; Ward et Lafferty, 2004). Ce phénomène correspond à une perturbation de l'association symbiotique entre le corail et les zooxanthelles, microalgues endosymbiotiques pouvant conduire à la mort du corail. L'étiologie du blanchissement est très variable et rarement élucidée, même si différents facteurs ont été incriminés, environnementaux comme l'augmentation de la température de l'eau et de sa turbidité, et pathogéniques par l'identification de plusieurs espèces de *Vibrio* associés. Alors que chez *Oculina patagonica*, *Vibrio shilonii* a été démontré comme étant responsable de cette pathologie en infection expérimentale (Ben-Haim, *et al.*, 1999), *Vibrio coralliilyticus* provoquerait le blanchissement du corail *Pocillopora damicornis* en Mer Rouge et en Océan Indien (Ben-Haim, *et al.*, 2003). Néanmoins, l'ensemble des travaux ont permis l'émergence d'une théorie holosymbiotique chez le corail : cette théorie repose sur le fait que le corail et l'ensemble des microorganismes qui lui sont associés (bactéries, virus, protistes, champignons et zooxanthelles) pourraient être considérés comme un holobionte, c'est-à-dire une association complexe de plusieurs organismes dans un même système symbiotique profitable à chaque membre et pouvant évoluer conjointement (Rohwer, *et al.*, 2002).

L'huître creuse héberge dans différents tissus une flore endogène diversifiée dont l'abondance apparaît variable au niveau individuel. (Colwell et Liston, 1960a; Prieur, *et al.*, 1990; Olafsen, *et al.*, 1993). A ce jour aucune étude n'a exploré le rôle de la flore microbienne associée à l'huître dans le maintien des équilibres métaboliques mais à l'instar du corail, il pourrait exister un ensemble de microorganismes participant activement à ces équilibres et notamment au contrôle d'éventuels agents pathogènes. Certains travaux initiés au cours de cette thèse ont permis de documenter la flore endogène de l'hémolymphe de l'huître et son rôle dans la sensibilité de celle-ci à une vibriose expérimentale (cf. Chapitre 3). Les résultats obtenus, bien que préliminaires, incitent vivement à la poursuite des recherches visant la caractérisation qualitative et quantitative de cette flore hémolympatique, des facteurs modulant sa structure et enfin, son implication dans la régulation du système immunitaire de l'huître (Loker, *et al.*, 2004).

Les interactions de type infectieuses ne peuvent être étudiées de façon « isolée » et l'ensemble du réseau composé par toutes les espèces inter-agissantes doit être considéré dans l'étude de la dynamique des épisodes de mortalité. Des approches d'écologie microbienne par métagénomique et métatranscriptomique devraient dans le futur apporter des éléments de réponse à ces interactions complexes, qu'elles soient bénéfiques ou pathogènes. Alors que la métagénomique permettrait d'analyser les changements de structures au niveau spécifique, l'analyse en métatranscriptomique permettrait l'identification des changements de réponse physiologique de la communauté bactérienne soumises à différentes conditions. Le schéma ci-dessous, extrait d'un article de DeLong (2009), repositionne au sein des disciplines « traditionnelles », ces approches de métagénomique qui

apparaissent dès lors, complémentaires mais difficilement contournables, et particulièrement pertinentes pour des perspectives d'études (Figure 50).

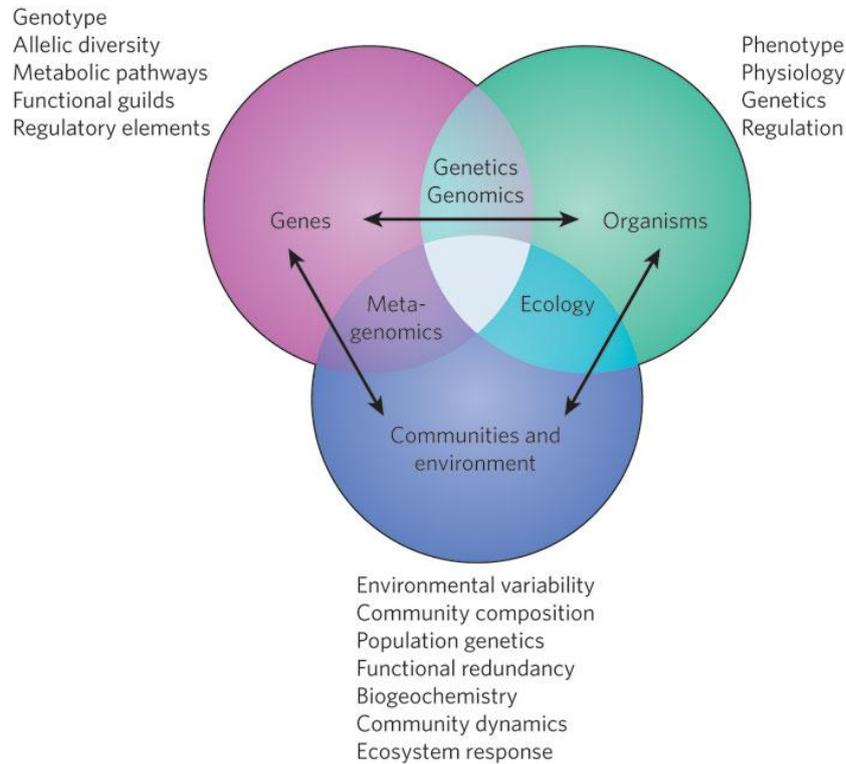


Figure 50 : Schéma conceptuel d'études d'organismes au sein d'un écosystème.

Les régions rose, bleue et vert, représentent les éléments fondamentaux de l'étude des systèmes : les gènes, les organismes et l'environnement. L'intersection entre ces éléments rend compte du domaine d'étude chevauchant : la génétique-génomique, la métagénomique et l'écologie. La partie bleu pâle centrale identifie le « sweet spot » dans lequel l'ensemble des informations peut être intégré et modélisé.

Les objectifs de telles approches appliquées à l'huître creuse *C. gigas*, pourraient être i. de caractériser la diversité spécifique de la communauté microbienne de l'hémolymphe de l'huître avant, pendant et après un épisode de mortalité estivale, ii. d'identifier la part variable et la part stable et persistante de cette flore et d'en décrire les compositions, iii. d'explorer le métatranscriptome microbien de cette flore endogène avant, pendant et après un épisode de mortalité estivale et enfin, iv. d'identifier des gènes bactériens de virulence et de valider leur rôle dans l'apparition de mortalités.

En conclusion, mes travaux de thèse ont permis d'apporter de nouveaux éléments de compréhension des interactions reliant des *Vibrio* et l'huître creuse *C. gigas*, notamment dans un contexte de pathologie. Ces éléments et les différents outils mis au point pourront être intégrés à de futures recherches sur les mortalités estivales dont l'impact est de plus en plus alarmant depuis 2008.

ANNEXES

Sommaire des Annexes

1	Projet Article 5 :	305
	Mise au point d'une protocole de PCR multiplexe qualitative pour la détection de <i>V. splendidus</i> et <i>V. aestuarianus</i> à partir d'isolats bactériens	
2	Article 6 :	311
	First evidence of a potential antibacterial activity involving the phenoloxidase system in the Pacific cupped oyster <i>Crassostrea gigas</i> haemocytes.	
3	Effet d'un traitement antibiotique	333
4	Valorisation des travaux de thèse	335

1 Projet Article 5 : Mise au point d'une protocole de PCR multiplexe qualitative pour la détection de *V. splendidus* et *V. aestuarianus* à partir d'isolats bactériens.

Un protocole de PCR multiplexe qualitative a été mis au point pour le diagnostic de *V. splendidus* et *V. aestuarianus* à partir d'isolats bactériens. Ce test a été développé dans le but de faciliter l'identification taxonomique de ces deux espèces de *Vibrio* associées aux épisodes de mortalité de *C. gigas*. Il a été transmis au réseau de laboratoires chargés des analyses en cas de hausse de mortalité des mollusques déclarée aux autorités compétentes et aux laboratoires chargés d'analyses dans le cadre d'autocontrôles aux initiatives privées. Ce protocole a été transféré suite à des formations du personnel de ces laboratoires au LGP et à la réalisation d'essais inter-laboratoires.

Ce travail fait l'objet d'une publication en cours de rédaction.

Protocole de PCRq multiplex qualitative pour la détection de *Vibrio splendidus* et de *Vibrio aestuarianus* à partir d'isolats bactériens

La PCRq multiplex qualitative est réalisée sur un thermocycleur Mx3000P™ (Stratagene®), à l'aide de deux sondes Taqman marquées « 16S probe » et « DNAj probe », spécifiques des espèces *Vibrio splendidus* et *V. aestuarianus* respectivement.

1. Extraction de l'ADN en faisant bouillir des isolats bactéries

Un isolat bactérien est récupéré à l'aide d'un cure-dent sur une boîte de Pétri contenant de la gélose nutritive, en piquant le cure dent au centre de la colonie. Le cure-dent est ensuite plongé dans un tube contenant 200µl d'eau de qualité Bio Mol. Les bactéries sont remises en suspension en tournant le cure-dent sur lui-même.

Les tubes sont bouchés et chauffés à 98 °C pendant 10 minutes. Les tubes sont alors refroidis brusquement à 4°C et utilisés immédiatement pour la réalisation de la PCRq multiplex.

2. Réalisation de la PCRq multiplex

Cinq (5) µl d'ADN extrait à partir d'un isolat bactérien sont amplifiés dans un volume total de 25µl. Les concentrations finales des différents composants de la PCR sont les suivantes : 1X Core PCR Buffer, MgCl₂ à 5mM, les dNTP à 0,8mM, les quatre amorces à 300nM chacune, les deux sondes à 200nM chacune et enfin la Hot start Taq polymérase (Sure Taq de Stratagene) utilisée à 0,05U/µl (soit 1,25 U/réaction).

2.1. Volume de réactifs pour la préparation d'un prémix permettant 100 réactions PCRq multiplex : Distribution de 20µl de prémix par puits PCR + 5 µl d'ADN bactérien

-Préparer un prémix sans la polymerase et les sondes Taqman (stable au moins 6 mois à -20°C).

Volumes à mélanger pour réaliser 100 réactions (25µl total/réaction PCRq multiplex):

- 1340 µl d'eau qualité BM
- 250 µl de MgCl₂ 50mM
- 100 µl de dNTPs 20mM
- 250µl de tampon 10x core PCR buffer
- 7,5 µl d'amorces SpF2 à 100 µM
- 7,5 µl d'amorces SpR2 à 100 µM
- 7,5 µl d'amorces DNAj F à 100 µM
- 7,5 µl d'amorces DNAj R à 100 µM

-Décongeler le premix et pipetter X µl de premix:

$$X = (\text{Nb d'extraits d'ADN à analyser} + \text{réalisation de 3 contrôles} + 2 \text{ réactions}) \times 2 \text{ (duplicats)} \times 19,65\mu\text{l}$$

-Ajouter la Sure Taq DNA polymerase (Agilent) à 5u/µl à raison de 0,25 µl par réaction PCRq multiplex entreprise.

-Ajouter les sondes « 16Sprobe » et « DNAj probe » (100 µM chacune) protégées de la lumière, à raison de 0,05µl par réaction PCRq multiplex et par sonde.

-Positionner la plaque PCRq sur un support conservant la plaque à 4°C et de façon prolongée.

- Répartir 20µl de premix additionné de Sure Taq + sondes Taqman dans chaque puits de la plaque PCR.

- Ajouter 5µl d'extraits ADN (Cf § 1. **Extraction de l'ADN en faisant bouillir des isolats bactériens**) à chaque puits.

- Positionner les bouchons.

-Centrifuger la plaque PCRq brièvement à 100g.

2.2. Réalisation de contrôles

Deux contrôles positifs sont réalisés lors de chaque série d'amplification par PCRq multiplex :

- Un extrait d'ADN génomique de *V. splendidus*, souche type, (fournie par l'IFREMER), obtenu en faisant bouillir une suspension bactérienne de cette souche.
- Un extrait d'ADN génomique de *V. aestuarianus*, souche type, (fournie par l'IFREMER), obtenue en faisant bouillir une suspension bactérienne de cette souche.

En outre,

Un contrôle négatif est réalisé lors de chaque série d'amplification par PCR :

- Utilisation de l'eau de qualité Bio Mol utilisée lors de la préparation du premix

2.3. Profil thermique de la réaction de PCRq multiplex

Une étape de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 10min suivie de 40 cycles comportant deux phases : 15 sec à 95°C et 90 sec à 60°C.

2.4. Dénomination des amorces et des sondes

NB : La sonde Taqman spécifique de *V. aestuarianus* est marquée en 5' au « Texas Red ».

La sonde Taqman spécifique de *V. splendidus* est marquée en 5' au « FAM ».

	<i>V. splendidus</i>	<i>V. aestuarianus</i>
Amorces sens	16S SpF2	DNAj F
Amorces antisens	16S SpR2	DNAj R
Sondes Taqman	16S probe	DNAj probe

2.5. Référence bibliographique

Saulnier D., De Decker S. et 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. *Journal of Microbiological Methods* 77 p.191-197.

2 Article 6 : First evidence of a potential antibacterial activity involving the phenoloxidase system in the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* haemocytes.

Andrea Luna-Acosta, Denis Saulnier, Mylène Pommier, Philippe Haffner,
Sophie De Decker, Tristan Renault, H el ene Thomas-Guyon

Submitted in Journal of Immunology, June 25th 2010

Title

First evidence of a potential antibacterial activity involving the phenoloxidase system in the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* haemocytes¹

Submitted in Journal of Immunology

June 25th 2010

Authors

Andrea Luna-Acosta^{*,2,3}, Denis Saulnier[†], Mylène Pommier^{*}, Philippe Haffner[†], Sophie De Decker[†], Tristan Renault[†], Hélène Thomas-Guyon^{*}

Affiliations

* Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 6250, CNRS-Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges - F-17042 La Rochelle Cedex 01, France

† Ifremer, Laboratoire de Génétique et Pathologie, Ronce-les-Bains, 17390 La Tremblade, France

¹ The Conseil Régional de Poitou-Charentes is acknowledged for financial support through the research project ‘POLERON’: Modifications chimiques de polluants organiques dans le bassin de Marennes-Oléron, toxicité des produits de dégradation sur l’huître creuse.

² Address correspondance to A. Luna-Acosta,

Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs),

UMR 6250, CNRS-Université de La Rochelle - 2 rue Olympe de Gouges - F-17042

La Rochelle Cedex 01, France

email : aluna1508@yahoo.com

tel : +33 (0)5 46 50 76 48

fax : +33 (0)5 46 50 76 63

³ Recipient of a PhD grant from the Conseil Général of the Charente-Maritime

⁴ Abbreviations used in this paper:

POs, phenoloxidasases;

HLS, haemocyte lysate supernatant;

L-DOPA, L-3,4-dihydroxyphenylalanine;

PPD, p-phenylenediamine;

PTU, 1-phenyl-2-thiourea;

DETC, diethyldithiocarbamate;

CTAB, cethyltrimethylammonium bromide;

OD, optical density.

Abstract

Phenoloxidases (POs) are a family of copper proteins including tyrosinases, catecholases and laccases. Although these enzymes are widely recognized as an integral part of bivalve immune defence system, experimental evidence is lacking that PO cascade participates in the direct killing of invading microorganisms in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Here, we report antibacterial effects of intermediates produced in POs catalyzed reactions against the oyster pathogens, *Vibrio splendidus* LGP32 and *Vibrio aestuarianus* 02/041. After being treated with *C. gigas* haemocyte lysate supernatant (HLS) and a common substrate of POs, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), *V. splendidus* LGP32 and *V. aestuarianus* 02/041 growth were affected. Moreover, after being treated with HLS and a specific substrate of laccases, p-phenylenediamine (PPD), *V. splendidus* LGP32 and *V. aestuarianus* 02/041 growth was strongly reduced. These effects were suppressed when the specific PO inhibitor, phenylthiourea (PTU), was added to the medium. Similar results were confirmed with partially purified fractions of HLS proteins, particularly in the presence of PPD for *V. splendidus* LGP32. These results suggest that antibacterial activities of HLS from *C. gigas* potentially involve phenoloxidase, and more particularly laccase catalysed reactions.

Keywords

laccase - antibacterial activity - *Vibrio* - oyster - immunity

Introduction

POs (EC 1.14.18.1) are a family of copper proteins including tyrosinases (EC 1.14.18.1), catecholases (EC 1.10.3.1) and laccases (EC 1.10.3.2). The three types of POs are able of o-diphenol oxidation. However, among these three enzymes, only tyrosinases can hydroxylate monophenols (e.g. L-tyrosine), and only laccases can oxidise p-diphenols and aromatic compounds containing amine groups (e.g. p-phenylenediamine) (1, 2). POs are the rate limiting enzymes in melanisation (3, 4), and play an important role in immune defence mechanisms in invertebrates (5). In these organisms, POs exist as an inactive form, proPO. Pathogen associated molecular patterns (PAMPs), such as peptidoglycans or lipopolysaccharides from bacteria and β -1,3-glucans from fungi are recognized by pattern-recognition receptors (PRRs). This will trigger the activation of a cascade of serine proteases that will activate PO-activating enzymes (PPAs), and therefore, the activation of the pro-enzyme proPO into PO (5).

The cupped Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1753) is an ecologically and economically important species that dominates over all other molluscs with respect to global world distribution and aquaculture production (6). However, massive summer mortalities of *C. gigas* have become a widespread concern in the world in recent decays (7-9). Studies have shown a positive correlation between *C. gigas* summer mortalities and the presence of pathogens (e.g. bacteria or viruses) (10). Moreover, defence mechanisms in invertebrates, particularly in bivalves, have shown to be affected by environmental factors (8). Recently, POs have been detected and identified in the haemolymph of the cupped Pacific oyster, *C. gigas* (11-13). Moreover, studies carried out in this organism have shown that the activity of POs can be modulated by environmental factors, such as the presence of heavy metals or hydrocarbons (14-16). In addition to that, the expression of a gene coding for a putative laccase in *C. gigas* has shown to be modulated in the presence of hydrocarbons (17). However, although POs seem to be play an important role in immune defence mechanisms in bivalves (18, 19), experimental evidence is lacking that POs participate in immune defences against microorganisms infecting this particular host.

Therefore, the aims of this study were (i) to study the implication of PO activity(ies) on *C. gigas* immune defence system through antimicrobial assays and (ii) to identify which type(s) of PO activity(ies) are implicated in this mechanism. For this purpose, different *C. gigas* tissues, i.e. the digestive gland, the gills, the mantle, the acellular fraction of the haemolymph and the HLS, were analysed for their ability to inhibit *in vitro* the growth of oyster bacterial pathogens related to *Vibrio splendidus* and *V. aestuarianus*. These bacterial pathogens were found to be associated to *C. gigas*

summer mortality outbreaks in France (20). A common substrate of POs, L-DOPA, a specific substrate of laccase, PPD, and a specific inhibitor of POs, PTU, were used for identification of POs activities, particularly in HLS. Furthermore, protein fractions obtained by partial purification of HLS were tested to confirm the implication of proteins in antibacterial activities.

Materials and methods

Oysters

Three-year-old Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (mean \pm SD; weight: 75.5 ± 8.7 g; length: 9 ± 3 cm) were purchased during October-November 2008 from shellfish farms in Aytré (Charente Maritime, France), on the French Atlantic coast, and were processed immediately after their arrival in the laboratory.

Preparation of oyster tissue extracts

After opening the oyster shells by cutting off the adductor muscle, haemolymph (0.5-1 ml) was withdrawn directly from the pericardial cavity, with a 1-ml syringe equipped with a needle (0.9 x 25 mm), and haemolymphs from 10 oysters were pooled (15). Haemolymph samples were centrifuged (260 g, 10 min, 4°C) to separate the cellular fraction (i.e., haemocytes) from the acellular fraction (12). Aliquots (100 μ l) were stored at -80°C. Each aliquot was used only once. The digestive gland, the gills and the mantle from 10 oysters were dissected and pooled. Haemocytes, digestive gland, gills and mantle were homogenized at 4°C in Tris buffer (0.1 M Tris HCl, 0.45 M NaCl, 26 mM MgCl₂ and 10 mM CaCl₂) adjusted to pH 7 (1 ml of buffer for HLS, 1 ml.g⁻¹ of fresh weight for the digestive gland and the mantle and 0.5 ml.g⁻¹ of fresh weight for the gills). Digestive gland, gills and mantle were lysed using an Ultra-Turrax (T25 basic, IKA-WERKE) at 19 000 rpm for 30 sec and a Thomas-Potter homogenizer (IKA-Labortechnik, clearance 0.13-0.18mm) at 200 rpm for 1 min, and centrifuged at 10 000g for 10 min at 4°C. The resulting supernatants were collected. Haemocytes were lysed using Thomas-Potter homogenizer at 200 rpm for 1 min and centrifuged at 10 000g for 10 min at 4°C. The resulting HLS was collected. The resulting digestive gland, gills, mantle, acellular fraction of the haemolymph and HLS samples were filtered at 0.22 μ m (Millipore membrane-Millipore Co., Bedford, MA, USA) to eliminate bacteria. Absence of bacterial development in filtered samples was tested by incubating the samples with Zobell medium and by measuring potential bacterial growth with a spectrophotometer at 620 nm wavelength during at least 7h (data not shown). Aliquots (100 μ l) were stored at -80°C. Each aliquot was used only once.

Preparation of protein fractions from haemocyte lysate supernatant

HLS was precipitated overnight with 60% saturated (NH₄)₂SO₄ solution at 4°C. After centrifugation at 10 000 g for 10 min at 4°C, the precipitate was dissolved in 1 ml Tris buffer (0.1 M Tris HCl, 0.45 M NaCl, 26 mM MgCl₂ and 10 mM CaCl₂) and dialyzed against the same buffer. Aliquots (100 μ l) of the dialyzates were stored at -80°C before being tested for PO-like activity.

Chemicals

PO substrates (dopamine, L-DOPA) and inhibitors (PTU, DETC), laccase substrate (PPD) and inhibitor (CTAB), mushroom tyrosinase and *Trametes versicolor* laccase were purchased from Sigma (France). The PO inhibitor, 2-ME, was purchased from MERCK (France).

Bacterial strains

Virulent *V. splendidus* LGP32 strain (8, 21) and *V. aestuarianus* 02/041 strain (8) isolated in experimental cohabitation trials (Ifremer, La Tremblade, France) and from the Ifremer experimental hatchery at Argenton (Brittany, France), respectively, were used in antibacterial assays. Bacteria were grown at 20 °C for 20 h in Marine Broth (Difco) under constant shaking until to reach the stationary phase. The bacterial culture concentrations were evaluated spectrophotometrically at an OD of 600 nm. Cells were centrifuged at 3 200 g for 10 min, the supernatant discarded and the resulting pellet resuspended in sterile artificial seawater to obtain an OD of 1 that corresponded to a concentration of $1-2 \cdot 10^9$ colony forming units per ml for both bacterial strains.

Phenoloxidase assays

Phenoloxidase-like (PO-like) activity was measured spectrophotometrically by recording the formation of o-quinones, by using the method described previously (13). For all conditions, assays were performed with three 10-oyster pools. Each pool was tested in triplicate wells and average rates were calculated. Results were systematically corrected for non-enzymatic autoxidation of the substrate. Specific activities (SA) were expressed in international units (IU) per mg of total protein. One IU is defined as the amount of enzyme that catalyzes the appearance of 1 μ mole of product per min (22).

Phenoloxidase inhibition assay

PO inhibition assay was performed by preincubating 10 μ l of PO inhibitor (prepared at various concentrations in Tris buffer) with 10 μ l of sample for 20 minutes, at 25°C. Then, PO assay was carried out with dopamine or PPD. Assays were performed with three 10-oyster pools. Each pool was tested in triplicate wells and average rates were calculated. Enzymatic oxidation (in the presence of PO inhibitor) was systematically corrected for non-enzymatic autoxidation of the substrate (in the presence of PO inhibitor).

Protein determination

The protein concentration of oyster tissue extracts was determined by the slightly modified Lowry method, as described previously (23). Serum albumin (Sigma-Aldrich, France) was used as standard.

Effect of L-DOPA and PPD-derived compounds on bacterial growth

Concentrations given in the following protocol correspond to final concentrations in the medium reaction, before adding Marine Broth. Resuspended bacteria cells (5.0 μl at OD of 1) were separately added to 100 μl of prepared oyster tissue extracts and 100 μl of L-DOPA (1.25 mM) or PPD solution (1.50 mM). The same protocol was used with PTU-treated HLS (100 μl). Two type of controls were performed either replacing substrates by 100 μl of Tris buffer as sterility controls of samples or replacing samples by 100 μl of Tris buffer to monitor the potential inhibitory effect of substrates on bacterial growth. After a 90 min incubation at 25°C, the samples were again incubated with 4.0 ml of Marine Broth (Difco) and grown at 25°C with constant shaking. Then, A_{620} readings were carried out at 1-2h intervals for 3-7 h. The different samples were maintained at 25 °C in a rotor (10 tours per minute) during all the experiment.

Effects of purified mushroom tyrosinase and Trametes versicolor laccase on bacterial growth

The same protocol used to study the effect of L-DOPA and PPD-derived compounds on bacterial growth was conducted in the presence of 100 μl of mushroom tyrosinase (1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, Sigma) or *Trametes versicolor* laccase (1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, Sigma).

Statistical analysis

All values are reported as mean \pm SD. Statistical analysis was carried out with STATISTICA 7.0. Values were tested for normality (Shapiro test) and homogeneity of variances (Bartlett test). For normal values, an ANOVA test was used to analyse the results, followed by a Dunnett post-hoc test. For non normal values, a Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's multiple comparisons test (24). Statistical significance was designed as being at the level of $p < 0.05$.

Results

Effect of PO-generated reactive intermediates on the growth of V. splendidus LGP32 strain in the presence of L-DOPA and oyster tissue extracts

When the different oyster tissue extracts (digestive gland, gills, mantle, acellular fraction of the haemolymph and HLS) were incubated in absence of L-DOPA with LGP32 strains, no inhibition of bacterial growth was observed (data not shown). When samples were preincubated with L-DOPA, LGP32 growth was reduced but only in the presence of HLS (Fig. 1). This effect was statistically significant after 5 and 6h of incubation in presence of Marine Broth. As a control, L-DOPA substrate was verified to display no toxic effect on LGP32 growth when used alone at 1.25 mM concentration (data not shown). Since inhibitory effects were noticed only with HLS and PO substrate, further studies were conducted with this oyster extract.

Effect of PO-generated reactive intermediates on the growth of V. splendidus and V. aestuarianus in the presence of L-DOPA or PPD and HLS

In order to confirm results obtained with LGP32, we decided (i) to test the effect of L-DOPA and HLS on an oyster bacterial pathogen phylogenetically distinct from *V. splendidus*, i.e. *V. aestuarianus* 02/041, and (ii) to test a PO substrate different from L-DOPA, i.e. PPD. Since PPD exerted an effect on bacterial growth in the absence of HLS (data not shown), results were expressed as the percentage of inhibition due to HLS (Table 1). In the presence of L-DOPA or PPD, a growth stimulation of 4 to 37 % was observed during the first hours of incubation (Table 1). However, in the presence of L-DOPA, a LGP 32 growth inhibition of 20.92 ± 8.27 , 42.79 ± 14.52 , 48.10 ± 15.07 and 45.38 ± 13.71 % was observed after 3 ,4 ,5 ,6 and 7h of incubation, respectively and a 02/041 growth inhibition of 19.87 ± 18.25 , 31.12 ± 22.35 and 30.91 ± 24.08 % was observed after 5, 6 and 7h of incubation, respectively (Table 1). Interestingly, when PPD was used as substrate a similar inhibition of LGP32 and 02/041 growths were observed: 17.93 ± 1.03 and 29.47 ± 0.90 % of inhibition for LGP 32 at 6 and 7h and 29.59 ± 6.23 % of inhibition for 02/041 at 7h (Table 1).

Effect of PO inhibitors on PO-generated reactive intermediates

In the absence of HLS, CTAB, DETC and 2-ME, but not PTU, exerted an inhibition on LGP32 bacterial growth (data not shown). Therefore, PO inhibitor effects were conducted only with the specific PO inhibitor, PTU. In the presence of PTU, the inhibition of LGP32 growth, produced in the presence of HLS and L-DOPA or PPD as substrates, was completely abolished, independently of the incubation time considered (Fig. 2a and b).

Effect of purified tyrosinase and laccase

In order to confirm that the bacterial growth inhibition observed was due to a laccase-type PO, a control was realized with purified mushroom tyrosinase and laccase from *Trametes versicolor*. Inhibition of bacteria growth by tyrosinase could not be monitored because darkening of the experimental wells interfered with turbidity measurements (data not shown). Inhibition by purified laccase from 32.55 ± 2.95 to 36.61 ± 10.93 % could be measured after 5, 6 and 7 incubation times and showed to be similar to growth inhibition observed with HLS and PO substrates (Table 1).

Effect of protein fractions from partially purified HLS and PTU on PO-generated reactive intermediates

Results obtained with LGP32, incubated with protein fractions from partially purified HLS from three different oyster pools, and with L-DOPA or PPD as substrates, were similar to those obtained with crude HLS, i.e. an inhibition of bacteria growth was observed (Fig. 3a). However, in the presence of PTU and with L-DOPA as substrate, no significant differences were observed between the conditions _bacteria + substrate + sample and _bacteria + substrate + sample + PTU. In contrast to this result, significant differences at incubation times of 5, 6 and 7 h were observed between these two conditions when PPD was used as substrate (Fig. 3b).

Discussion

The aim of the current work was (i) to study the implication of PO activity (ies) from *C. gigas* on immune oyster defence capacities through antimicrobial assays and (ii) to identify which type(s) of PO activity(ies) may be implicated on antibacterial activities. In other invertebrates, and specially in crustaceans, antibacterial activities have been detected in haemocytes, plasma or hepatopancreas (25). In *C. gigas*, PO activities have been detected in the haemolymph (11-13). Therefore, the first aim of the current work was to study the antibacterial effects of different tissues from *C. gigas*, i.e. the digestive gland, the gills, the mantle, the plasma and the HLS, on *V. splendidus* LGP32 growth. No oyster tissue exerted an antibacterial effect in the absence of added PO substrates. In the presence of L-DOPA, only HLS inhibited bacterial growth (Fig. 1). This result is in agreement with the fact that haemocytes, when compared to other tissues, play a crucial role in immune defence reactions in invertebrates (26). It is important to notice however that inhibition of bacterial growth by HLS was reported only when L-DOPA or PPD were added in assays (Fig. 1, Table 1). This suggests that components present in the HLS are missing to elicit an immune response, or could not be detected because of insufficient amount or rapid degradation. These results differ from previous studies conducted in crustaceans and insects including the squat lobster *Galathea strigosa*, the Norway lobster, *Nephrops norvegicus*, the common shrimp, *Crangon crangon*, the giant Antarctic isopod, *Glyptonotus antarcticus* and the locust *Locusta migratoria* where HLS were able to elicit an inhibitory effect on bacteria growth, in the absence of PO substrates (25, 27). It is well known that inactive prophenoloxidasases from hemocytes in insects and crustaceans are activated through a protease cascade. This cascade is initiated by cell wall fragments of microbes and the final step results in a limited proteolysis of the prophenoloxidase by a specific serine protease (5). The defence cascade of bivalves, however, remains unknown. The results reported in the present study suggest that some components necessary to elicit the activation of the oyster prophenoloxidase system are missing in the HLS. In these conditions, we may hypothesize that the initiation of the cascade through *V. splendidus* cell wall could not occur. Therefore, it could be assumed that crucial components for PO cascade activation were removed when the HLS was prepared, or could not be detected because of insufficient amounts and/or rapid degradation. Thus, it should be interesting to study in more detail the roles exerted by haemocyte membranes and acellular fraction of the haemolymph on PO cascade activation (27).

In the presence of L-DOPA or PPD, bacterial growth stimulation was observed during the first hours of incubation and could be due to a stimulating effect of bacterial growth in the condition containing the sample and the Zobell medium versus the condition containing only the Zobell medium. It should be noted also that, in the current study, antibacterial effects were exerted only temporary. Adding L-

DOPA as substrate, antibacterial effects were observed after 3, 4, 5 and 6h of incubation but then faded away after 7h of incubation (Table 1). With PPD as substrate, antibacterial effects were observed after 6 and/or 7h of incubation (Table 1). These results suggest that PO-generated reactive intermediates can only exert a transient effect. Moreover, this transient effect was also observed on *V. aestuarianus* 02/041 growth, independently of the used PO substrate. It could be interesting to study factors that may extend or reduce these transient effects, for a better understanding of PO cascade modulations, e.g. to add L-DOPA or PPD during bacterial growth tests to see if the effect on bacterial growth remains.

Results with both strains, belonging to phylogenetically distinct units, suggest that PO-generated reactive intermediates could exert an effect on different oyster pathogens. Previous studies have reported that PO cascades may have not only antibacterial effects but also virucidal effects (28). Therefore, the effect of HLS and PO substrates in the presence of other bacteria or viruses, pathogens for *C. gigas*, could be further investigated.

Even if an antibacterial effect was observed for both *Vibrio* strains in the presence of HLS and PO substrates, it is noted that PO substrates may also be used by other enzymes such as peroxidases. Therefore, the next step in our study consisted on verifying that the inhibition of bacteria growth observed with HLS, and L-DOPA or PPD as substrates, was due to a PO-like activity. For this, we followed LGP32 growth in the presence of HLS, PO substrates, and the specific inhibitor of PO, PTU. Antibacterial effects were inhibited in the presence of PTU. These results are in agreement with previous studies carried out in the amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense* where the antibacterial activity in presence of L-DOPA as substrate was inhibited in the presence of PTU (29). Whether tyrosinase, catecholase or laccase are implicated in L-DOPA reactions remains unresolved. Previous studies suggest however the absence of tyrosinase-like activity and the presence of a laccase-like activity in haemocytes (13). Results with mushroom tyrosinase however did not help to elucidate this question. In the current study, tyrosinase could not be monitored because darkening of the wells in the assays. This darkening may have been due to phenoloxidase activity and melanin formation by tyrosinase (30). These results show the limits of spectrophotometrical techniques for bacterial growth survey. Other non spectrophotometrical-based techniques such as RT-qPCR could be used in this type of studies. Furthermore, because of their high sensitivity, this technique would allow to use low concentrated inocula which will in turn increase the sensitivity of the antimicrobial test (31). Results with purified laccase from *Trametes versicolor* are similar to those obtained with HLS, suggesting that the antibacterial effect observed with L-DOPA as substrate is due to a laccase-like activity.

Antibacterial effects with PPD (1.50 mM) as substrate were higher than with L-DOPA (1.25 mM) as substrate. Results obtained with this substrate could be due also to the fact that in PPD oxidation reactions, reactive semiquinones are produced while in L-DOPA oxidation reactions quinones, which are more stable, are produced. Reactive semiquinones may react with O₂ to yield a superoxide radical (O₂^{•-}) that may contribute to the production of other semiquinones or other oxygen radicals, that can

be deleterious for *Vibrio* species (32). In both cases, these results suggest that phenoloxidase catalyzed reactions are an integral component of *C. gigas* defence system involving the production of intermediates, e.g. quinones, which kills invading microorganisms.

In order to confirm that the signal observed was due, in part, to a protein source, the next step in our study consisted on partially purifying HLS. Protein fractions obtained were tested for antibacterial activity in the presence of L-DOPA or PPD as substrates. Surprisingly, antibacterial effect observed in the presence of L-DOPA as substrate was not abolished by PTU while antibacterial effect observed in the presence of PPD was completely abolished by PTU. It should be noted that antibacterial effect of L-DOPA (in the absence of PTU) is less important in partially purified HLS when compared to crude HLS, suggesting a partial loss of PO activity due to the purification process. Nonetheless, in the presence of the laccase substrate PPD, antibacterial activity was completely abolished by PTU, in crude and in partially purified HLS. Roles of laccases have been described in plants, fungi, bacteria and insects (33-35). However, this is the first time to the best of our knowledge that a laccase-like activity is shown to be implicated in immune defence mechanisms in a mollusc species. This can be related to the recent identification of a gene coding a multicopper oxidase/laccase in the Pacific oyster, *C. gigas* (Renault et al., pers. com. - GenBank accession EU678320). Nevertheless, many questions remain unresolved. For example, whether the intracellular activities represent actual intracellular laccases, extracellular laccases in the process of being exported, or a combination of the two, remains to be determined. Therefore, further studies on the role and mechanisms of action of laccases should be conducted in invertebrates, and more particularly in molluscs of high economic value such as *C. gigas*.

In summary, specific chemical inhibitor of PO or of proPO activation, PTU, and addition of the enzyme substrates L-DOPA or PPD, suggested that a constitutive innate antibacterial immune response attributable to the activity of PO is capable of limiting *V. splendidus* LGP32 and *V. aestuarianus* 02/041 infections in *C. gigas*, although this effect appears in our *in vitro* trial as transitional. Antibacterial effects could be due to products of the haemocyte enzyme PO cascade, including quinone, superoxide anion and hydrogen peroxide. Given the potentially important roles that these enzymes, in particular laccases, might play in bivalve immune defence mechanisms, more detailed investigation of their activities is clearly warranted.

References

1. Solomon, E., U. Sunduran, and T. Machonkin. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96:2563-2606.
2. Thurston, C. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Soc. Gen. Microbiol.* 140:19.
3. Sanchez-Ferrer, A., J. Rodriguez-Lopez, F. Garcia-Canovas, and F. Garcia-Carmona. 1995. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. et Biophys. Acta* 1247:1-11.
4. Chase, M., K. Raina, J. Bruno, and M. Sugumaran. 2000. Purification, characterization and molecular cloning of prophenoloxidases from *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30:953-967.
5. Cerenius, L., B. Lee, and K. Söderhäll. 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.* 29:263-271.
6. FAO. 2005. Aquaculture Production: Quantities 1995-2002. Fishstat Plus ed.
7. Cheney, D., E. Macdonald, and R. Elston. 2000. Summer mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington. *J. Shellfish Res.* 19:353-359.
8. Garnier, M., Y. Labreuche, C. Garcia, M. Robert, and J. Nicolas. 2007. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microb. Ecol.* 53:187-196.
9. Huvet, A., A. Herpin, L. Dégremont, Y. Labreuche, J. Samain, and C. Cunningham. 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.
10. Nicolas, J., T. Renault, B. Gagnaire, C. Garcia, M. Garnier, M. Gay, Y. Labreuche, F. Le Roux, L. Miossec, J. Pepin, and D. Saulnier. 2007. Les risques associés aux pathogènes. In *Mortalité estivale de l'huître creuse Crassostrea gigas: Défi MOREST*, Ifremer/Quae ed. J. Samain, and H. McCombie, eds. 229-269.
11. Luna-Gonzalez, A., A. Maeda-Martinez, F. Vargas-Albores, F. Ascencio-Vallea, and M. Miguel Robles-Mungaraya. 2003. Phenoloxidase activity in larval and juvenile

- homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish Shell. Immunol.* 15:275-282.
12. Hellio, C., A. Bado-Nilles, B. Gagnaire, T. Renault, and H. Thomas-Guyon. 2007. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in vitro. *Fish Shell. Immunol.* 22:433-440.
 13. Luna-Acosta, A., E. Rosenfeld, M. Amari, I. Fruitier-Arnaudin, P. Bustamante, and H. Thomas-Guyon. 2010. First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shell. Immunol.* 28:719-726.
 14. Bado-Nilles, A., B. Gagnaire, H. Thomas-Guyon, S. Le Floch, and T. Renault. 2008. Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Toxicol. in Vitro* 22:1610-1617.
 15. Gagnaire, B., H. Thomas-Guyon, and T. Renault. 2004. In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish Shell. Immunol.* 16:501-512.
 16. Luna-Acosta, A., P. Bustamante, J. Godefroy, I. Fruitier-Arnaudin, and H. Thomas-Guyon. 2010. Seasonal variation of pollution biomarkers to assess the impact on health status of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* exposed in situ. *Env. Sci. Pol. Res.* 17:999-1008.
 17. Bado-Nilles, A., S. Le Floch, T. Renault, N. Faury, M. Auffret, C. Quentel, and H. Thomas-Guyon. 2008. Effects of two oils on immune parameters and on the expression of immune related genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. In *Physiomar*.
 18. Peters, R., and D. Raftos. 2003. The role of phenoloxidase suppression in QX disease outbreaks among Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Aquaculture* 223:29-39.
 19. Jordan, P., and L. Deaton. 2005. Characterization of phenoloxidase from *Crassostrea virginica* hemocytes and the effect of *Perkinsus marinus* on phenoloxidase activity in the hemolymph of *Crassostrea virginica* and *Geukensia demissa*. *J. Shellfish Res.* 24:477-482.
 20. Saulnier, D., S. De Decker, P. Haffner, L. Cobret, M. Robert, and C. Garcia. 2009. A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster

- Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. *Microb. Ecol.* 59:787-798.
21. Gay, M., T. Renault, A. Pons, and F. Le Roux. 2004. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Dis. Aquat. Organ.* 62:65-74.
 22. Fenoll, L., J. Rodriguez-Lopez, F. Garcia-Molina, F. Garcia-Canovas, and J. Tudela. 2002. Unification for the expression of the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. *Int. U. Biochem. Mol. Biol. Life* 54:137-141.
 23. Smith, P., R. Khron, G. Hermanson, A. Mallia, F. Gartner, M. Provanzano, E. Fujimoto, N. Goeke, B. Olson, N. Goeke, B. Olson, and D. Klenk. 1985. Measurement of a protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150:76-85.
 24. Zar, J. 1984. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, New Jersey.
 25. Chisholm, J., and V. Smith. 1995. Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustaceans species. *Comp. Biochem. Phys. A* 110:39-45.
 26. Söderhäll, K., and L. Cerenius. 1998. Role of prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10:23-28.
 27. Rowley, A., J. Brookman, and N. Ratcliffe. 1990. Possible involvement of the prophenoloxidase system of the locust, *Locusta migratoria*, in antimicrobial activity. *J. Invert. Path.* 56:31-38.
 28. Shelby, K., and H. Popham. 2006. Plasma phenoloxidase of the larval tobacco budworm, *Heliothis virescens*, is virucidal. *J. Insect Sci.* 13:1-12.
 29. Li, G., S. Zhang, and H. Li. 2001. Ultrastructural localization and antibacterial activity of phenoloxidase in amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense*. *J. Marine Biol. Assoc. United Kingdom* 81:705-706.
 30. Smith, V., and K. Söderhäll. 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 15:251-261.
 31. Saulnier, D., S. De Decker, and P. Haffner. 2009. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: A useful tool for epidemiological studies. *J. Microbiol. Methods* 77:191-197.
 32. Guillen, F., M. Martinez, C. Munoz, and A. Martinez. 1996. Quinone redox cycling in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* leading to extracellular production of superoxide anion radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 339:190-199.
 33. Burke, R., and J. Cairney. 2002. Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 12:105-116.

34. Mayer, A. 1987. Polyphenol oxidases in plants - recent progress. *Phytochemistry* 26:11-20.
35. Dittmer, N., R. Suderman, H. Jiang, Y. Zhu, M. Gorman, K. Kramer, and M. Kanost. 2004. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34:29-41.

Table 1

Effect of PO-generated reactive intermediates on *V. splendidus* LGP32 and *V. aestuarianus* 02/041 growth, with L-DOPA (1.25 mM) and PPD (1.50 mM) as substrate. Inhibition due to laccase from *Trametes versicolor* or to HLS (in %) corresponded

correspond to bacterial growth stimulation.

Treatments	Time (h)	0	3	4	5	6	7
LGP 32 + laccase from <i>T. versicolor</i> + L-Dopa (1.25 mM)		-37.08 ± 6.82	12.00 ± 17.22	13.01 ± 10.04	36.61 ± 10.93 *	36.51 ± 9.74 *	32.55 ± 2.95 *
LGP 32 + HLS + L-Dopa (1.25 mM)		-4.23 ± 7.42	20.92 ± 8.27 *	42.79 ± 14.52 *	48.10 ± 15.07 *	45.38 ± 13.71 *	28.01 ± 14.13
LGP 32 + HLS + PPD (1.50 mM)		-16.28 ± 7.02	-15.09 ± 9.29	-13.98 ± 3.19	-2.48 ± 13.81	17.93 ± 1.03 *	29.47 ± 0.90 *
02/041 + HLS + L-Dopa (1.25 mM)		2.67 ± 4.41	N.D.	2.90 ± 7.57	19.87 ± 18.25	31.12 ± 22.35 *	30.91 ± 24.08
02/041 + HLS + PPD (1.50 mM)		-30.95 ± 7.05	-22.12 ± 2.35	-16.89 ± 6.46	-13.94 ± 5.66	3.59 ± 5.55	29.59 ± 6.23 *

N.D. Not determined

Figure 1**Effect of HLS on *V. splendidus* LGP32 growth, with or without L-DOPA (1.25 mM).**

Absorbance readings were taken from the cultures at different intervals and plotted against time. Mean \pm SD, n=9, *= statistical difference for $p < 0.05$ between LGP 32 and LGP32+HLS+L-Dopa conditions.

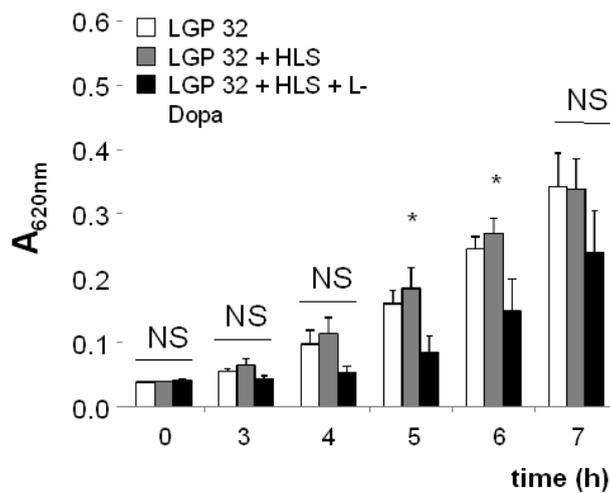


Figure 2

Effect of crude HLS and the specific PO inhibitor, PTU, on *V. splendidus* LGP32 growth, with 1.25 mM L-DOPA (a) or with 1.50 mM PPD (b) as substrates. Absorbance readings were taken from the cultures at different intervals and plotted against time. Mean \pm SD, n=9, *= statistical difference for $p < 0.05$ between LGP 32+substrate+HLS and LGP 32+substrate+HLS+PTU.

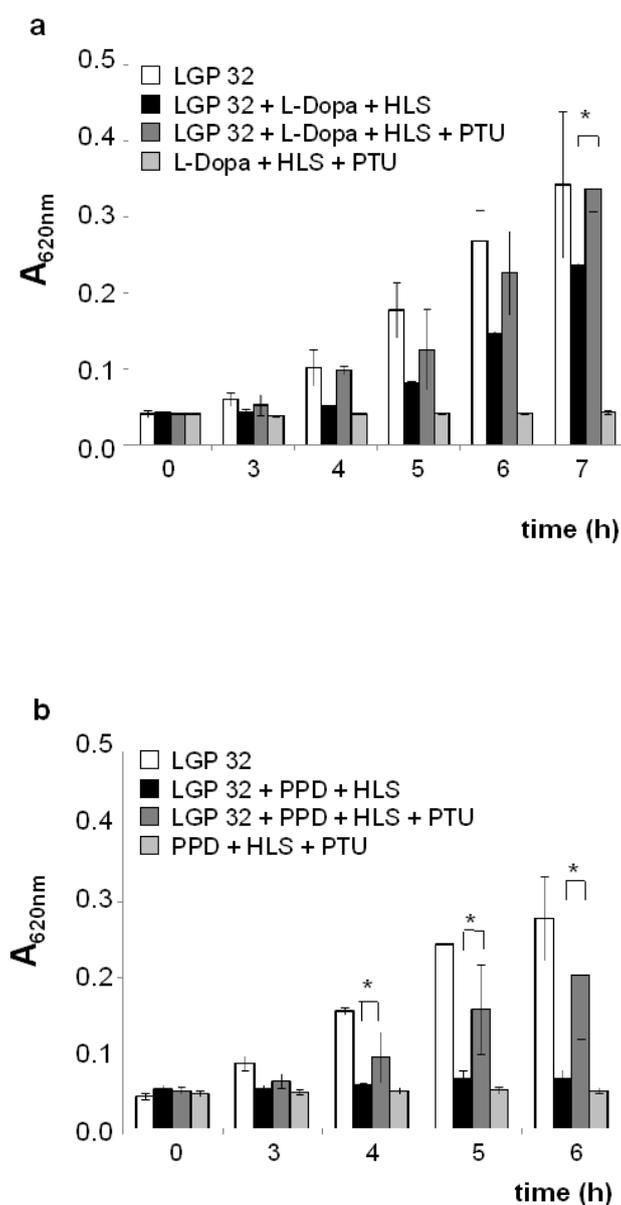
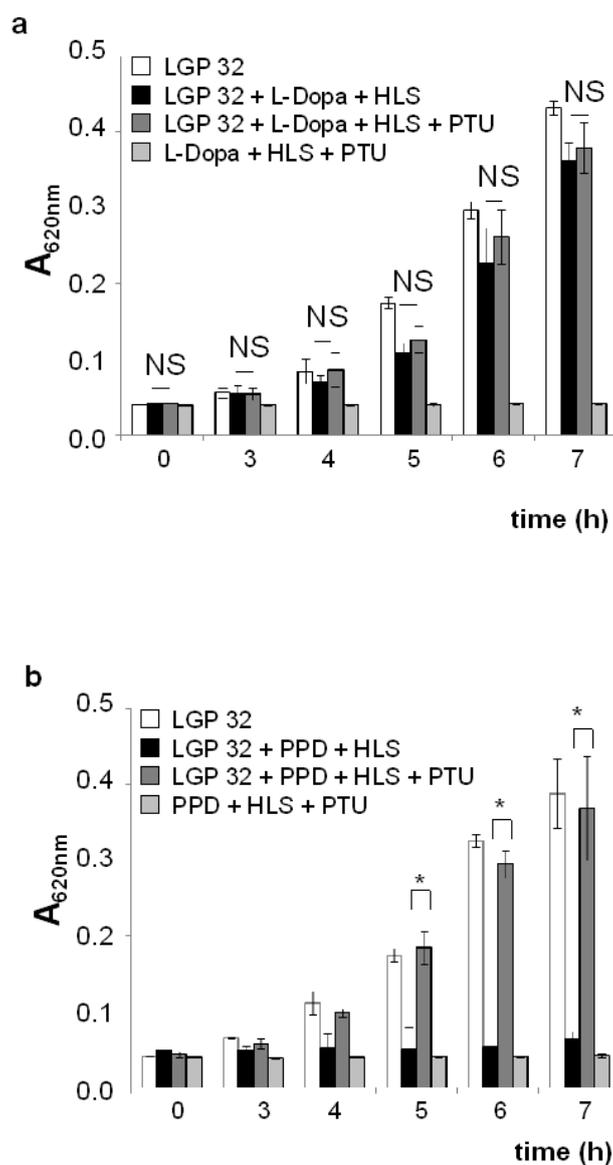


Figure 3

Effect of protein fractions from partially purified HLS and PTU on *V. splendidus* LGP32 growth, with 1.25 mM L-DOPA (a) or with 1.50 mM PPD (b) as substrates. Absorbance readings were taken from the cultures at different intervals and plotted against time. Mean \pm SD, n=9, *= statistical difference for $p < 0.05$ between LGP 32+substrate+HLS and LGP 32+substrate+HLS+PTU.

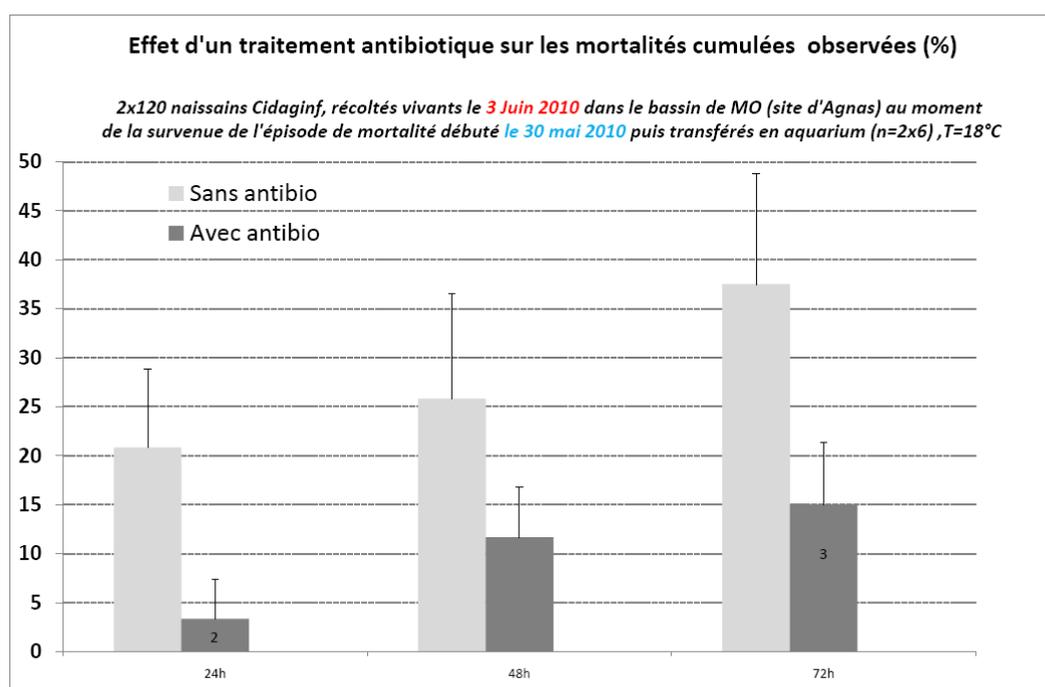


3 Effet d'un traitement antibiotique

Afin de renseigner la nature de l'agent infectieux impliqué dans des épisodes de mortalité de *C. gigas* observés fin mai 2010 sur un site ostréicole du bassin de Marennes-Oléron (banc d'Agnas), des expérimentations visant à évaluer l'effet d'un traitement antibiotique sur ces mortalités en cours ont été réalisées au LGP. Les huîtres trouvées encore vivantes ont été collectées au sein de lots d'huîtres subissant des mortalités *in situ* puis transférées dans les installations du LGP. Les animaux ont été placés dans des aquariums (J0) remplis d'eau de mer traitée aux UV (n=20), puis traités ou non avec un antibiotique à large spectre vis-à-vis des bactéries Gram négatif.

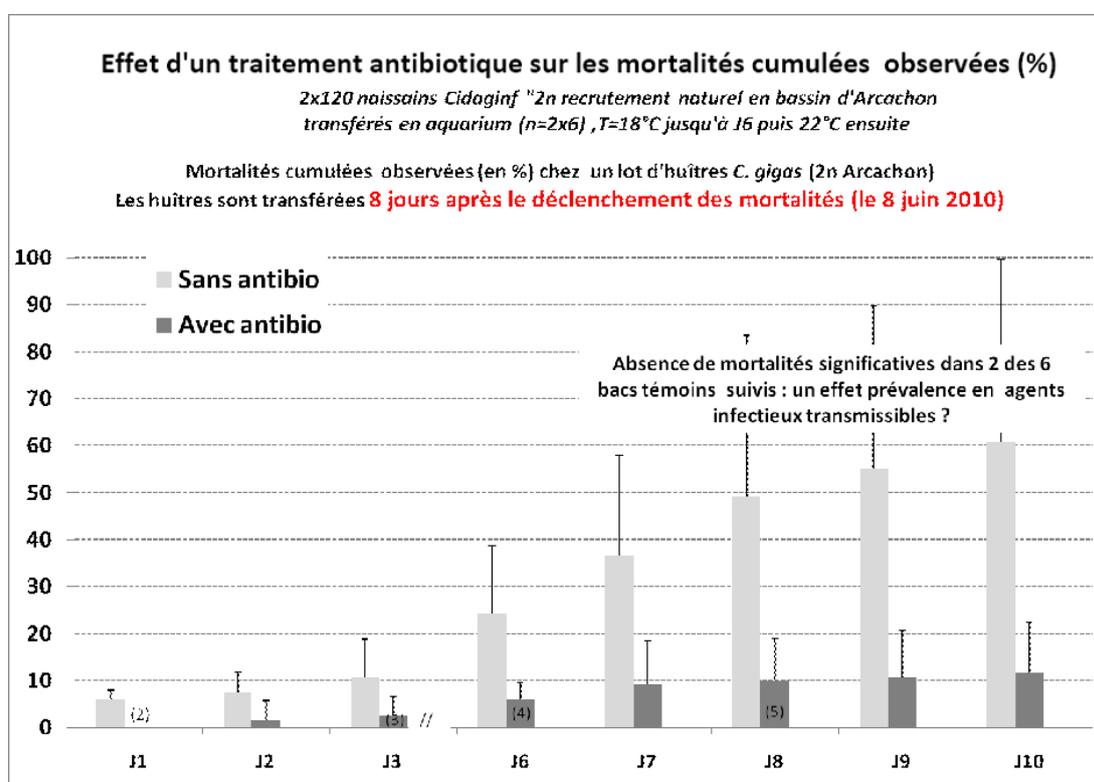
Les résultats révèlent la nature bactérienne de l'agent causal des mortalités observées chez ces lots d'huîtres prélevées dans le bassin de Marennes-Oléron. Les mortalités résiduelles observées chez les animaux traités aux antibiotiques suggèrent soit une posologie non adéquate ou non optimale, soit une cause non exclusive suggérant l'implication d'un autre agent infectieux dans ces épisodes de mortalité. Des analyses diagnostiques en PCR quantitative ciblant les *Vibrio* et OsHV-1 réalisées sur des animaux vivants ou morts récoltés au cours de cette expérimentation devraient permettre d'apporter des informations complémentaires.

Résultats de l'expérimentation 1 :



Plusieurs lots d'huîtres ont été testés. Aucun effet différentiel du traitement antibiotique n'a été observé entre les lots d'huîtres testés : le graphique ci-dessus représente donc les mortalités cumulées observées tous lots confondus (12 aquariums, 20 ind./aquarium, écarts types représentant la variabilité inter-bac). L'antibiotique réduit les mortalités sans les annihiler pour autant. La faiblesse physiologique des huîtres ou les forts niveaux d'infection probables à J0 (4 jours après le déclenchement des mortalités *in situ*) pourrait expliquer la réduction de l'efficacité des traitements antibiotiques.

Résultats de l'expérimentation 2 :



Seul un lot d'huîtres diploïdes (recrutement Arcachon) a pu être testé 8 jours après le déclenchement des mortalités (le 8 juin 2010), ne disposant plus d'un nombre suffisant d'animaux provenant d'autres lots suivis *in situ*. L'antibiotique réduit considérablement les mortalités dans les 6 bacs suivis. Il est intéressant de noter que deux des 6 bacs témoins suivis ne subissent pas de mortalités significatives. Les traitements antibiotiques présentent une réelle efficacité (environ 10% de mortalité cumulée à J10) versus 60% pour les bacs contrôles.

4 Valorisation des travaux de thèse

Articles scientifiques

Publiés :

Saulnier D., **De Decker S.** et 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. Journal of Microbiological Methods. 77, 191-197.

Saulnier D., **De Decker S.**, Haffner P., Corbet L., Robert M. et Garcia C. (2010). A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. Microbial Ecology. 59, 787-798.

Soumis :

De Decker S., Normand J., Saulnier D., Pernet F., Castagnet S. et Boudry P. (*soumis*). Responses of diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* to *Vibrio* challenge in relation to their reproductive status. Journal of Invertebrate Pathology.

De Decker S. et Saulnier D. (*soumis*). Evidence of an immediate but short term response of *Crassostrea gigas* oyster induced by virulent or avirulent *Vibrio* bacteria. Applied and Environmental Microbiology.

Luna-Acosta A., Saulnier D., Pommier M., Haffner P., **De Decker S.**, Renault T. et Thomas-Guyon H. (*soumis*). First evidence of a potential antibacterial activity involving the phenoloxidase system in the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* haemocytes. Journal of Immunology.

Communications orales

De Decker S. (2008). Etude de la virulence de *Vibrio* pathogènes en relation avec la variabilité de la réponse chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Journées de Doctorants, Univ. De La Rochelle, Comm. Orale, 22 mai 2008.

De Decker S., Haffner P., Soussi N., Couraleau Y., Saulnier D. (2009). Caractérisation des interactions entre l'huître creuse *Crassostrea gigas* et des vibrions pathogènes : apports de modèles d'infection expérimentale. Congrès ImmunInv' 2009, Immunité des Invertébrés, Poitiers, Book of Abstracts p. 52.

De Decker S., Haffner P., Soletchnik P., Cobret L., Normand J., Castagnet S., Boudry P., Saulnier D. (2009). New insights in the interactions studies between *Vibrio* bacterial pathogens and *Crassostrea gigas*. Journées des Doctorants, Ifremer Brest, Oct. 14-15.

De Decker S., Haffner P., Soletchnik P., Cobret L., Normand J., Castagnet S., Boudry P. et Saulnier D. (2009). New insights in the interactions studies between *Vibrio* bacterial pathogens and *Crassostrea gigas*. 14th EAFP International Conference, Pragues, Sept. 14-19, Oral Comm. Book of Abstract, p. 123.

De Decker S., Normand J., Castagnet S., Haffner P., Boudry P. et Saulnier D. (2009). What's new about relationships between *Vibrio* and *Crassostrea gigas* summer mortality? Annual Meeting and Technical Workshop of the National Reference Laboratories for Mollusc Diseases – 2009 Ifremer, La Tremblade, 16th-19th March 2009, Oral Comm.

Posters

De Decker S. (2007). Etude de la virulence des *Vibrio* pathogènes en relation avec la variabilité de la réponse chez l'huître creuse. Doctoriales Poitou-Charentes 17-22 juin 2007, Poster.

De Decker S., Normand J., Duperthuy M., Boudry P. & Saulnier D. (2007). Modulations of the interactions between pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* and *Vibrio* according to bacterial virulence and to genetic and physiological status of host. Vibrio 2007 meeting, Pasteur Institute, Paris, 28-30 Nov, Poster Book of Abstracts, p.192.

Saulnier D., **De Decker S.**, Haffner P., Duperthuy M., & Le Roux F. (2007). Development of diagnostic tools for the detection of *Vibrio* species and pathogenic strains associated with mortalities of cultured pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in France. Vibrio 2007 meeting, Pasteur Institute, 28-30 Nov, Poster Book of Abstracts, p. 191.

De Decker S. (2008). Etude de la virulence de *Vibrio* pathogènes en relation avec la variabilité de la réponse chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Journées des Doctorants, Université de La Rochelle, 22 mai 2008, Com. Orale & Poster.

De Decker S., Haffner P., Soletchnik P., Cobret L., Normand J., Castagnet S., Boudry P., Saulnier D. (2009). New insights in the interactions studies between *Vibrio* bacterial pathogens and *Crassostrea gigas*. Journées des Doctorants, Ifremer Brest, Oct. 14-15.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

- Actis L.A., Fish W., Crosa J.H., Kellerman K., Ellenberger S.R., Hauser F.M. et Sanders-Loehr J.** (1986). Characterization of anguibactin, a novel siderophore from *Vibrio anguillarum* 775(pJM1). *Journal of Bacteriology* 167, p.57-65.
- Actis L.A., Tolmasky M.E., Crosa L.M. et Crosa J.H.** (1995). Characterization and regulation of the expression of FatB, an iron transport protein encoded by the pJM1 virulence plasmid. *Molecular Microbiology* 17, p.197-204.
- Adams A. et Thompson K.D.** (2006). Biotechnology offers revolution to fish health management. *Trends in Biotechnology* 24, p.201-205.
- Aguirre-Guzman G., Vazquez-Juarez R. et Ascencio F.** (2001). Differences in the susceptibility of American white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species. *Journal of Invertebrate Pathology* 78, p.215-219.
- Akeda Y., Nagayama K., Yamamoto K. et Honda T.** (1997). Invasive phenotype of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Infectious Diseases* 176, p.822-824.
- Alabi A.O., Jones D.A. et Latchford J.W.** (1999). The efficacy of immersion as opposed to oral vaccination of *Penaeus indicus* larvae against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture* 178, p.1-11.
- Aladaileh S., Nair S.V. et Raftos D.A.** (2007). Induction of phenoloxidase and other immunological activities in Sydney rock oysters challenged with microbial pathogen-associate molecular patterns. *Fish & Shellfish Immunology* 23, p.1196-1208.
- Allam B. et Ford S.E.** (2006). Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following *in vitro* challenge. *Fish & Shellfish Immunology* 20, p.374-383.
- Allam B., Paillard C. et Auffret M.** (2000). Alterations in Hemolymph and Extrapallial Fluid Parameters in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*, Challenged with the Pathogen *Vibrio tapetis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 76, p.63-69.
- Allen S.K. et Downing S.L.** (1986). Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 102, p.197-208.
- Allen S.K. et Downing S.L.** (1990). Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: Gametogenesis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 47, p.1213-1222.
- Allen S.M. et Burnett L.E.** (2008). The effects of intertidal air exposure on the respiratory physiology and the killing activity of hemocytes in the pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 357, p.165-171.
- Alsina M. et Blanch A.** (1994). A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology* 76, p. 79-85.

- Alvarez J.D., Austin B., Alvarez A.M. et Reyes H.** (1998). *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela. *Journal of Fish Diseases* 21, p.313-316.
- Amann R.I., Ludwig W. et Schleifer K.H.** (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59, p.143-169.
- Andrews S.C., Robinson A.K. et Rodriguez-Quinones F.** (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews* 27, p.215-237.
- Anguiano-Beltrán C., Searcy-Bernal R. et Lizárraga-Partida M.L.** (1998). Pathogenic effects of *Vibrio alginolyticus* on larvae and postlarvae of the red abalone (*Haliotis rufescens*). *Diseases of Aquatic Organisms* 33, p.111-118.
- Angulo F.J.** (2000). Antimicrobial agents in aquaculture: potential impact on health. *APUA Newsletter* 18, p.1-6.
- Argue B.J., Arce S.M., Lotz J.M. et Moss S.M.** (2002). Selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus. *Aquaculture* 204, p.447-460.
- Arijo S., Rico R., Chabrilion M., Diaz-Rosales P., Martínez-Manzanares E., Balebona M.C., Magariños B., Toranzo A.E. et Moriñigo M.A.** (2005). Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases* 28, p.33-38.
- Attridge S.R., Manning P.A., Holmgren J. et Jonson G.** (1996). Relative significance of mannose-sensitive hemagglutinin and toxin-coregulated pili in colonization of infant mice by *Vibrio cholerae* El Tor. *Infection and Immunity* 64, p.3369-3373.
- Austin B.** (2010). Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology* 140, p.310-317.
- Austin B. et Austin D.A.** (2007). Bacterial fish pathogens. Diseases in farmed and wild fish. Ed. Springer Praxis Books in Aquatic and Marine Sciences. *Praxis Publishing, UK*, 594p.
- Austin B., Pride A.C. et Rhodie G.A.** (2003). Association of a bacteriophage with virulence in *Vibrio harveyi*. *Journal of Fish Diseases* 26, p.55-58.
- Austin B., Stuckey L., Robertson P., Effendi I. et Griffith D.** (1995). A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases* 18, p.93-96.
- Austin B. et Zhang X.** (2006). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology* 43, p.119-124.
- Azevedo C. et Villalba A.** (1991). Extracellular giant rickettsiae associated with bacteria in the gill of *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Journal of Invertebrate Pathology* 58, p.75-81.

-B-

- Bachère E., Gueguen Y., Gonzalez M., de Lorgeril J., Garnier J. et Romestand B.** (2004). Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological Reviews* 198, p.149-168.
- Bauerle P.A. et Henkel T.** (1994). Fonction and activation of NF- κ B in the immune system. *Annual Review in Immunology* 12, p.141-179.

- Balcázar J.L., de Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Cunningham D., Vendrell D. et Múzquiz J.L.** (2006a). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114, p.173-186.
- Balcázar J.L., de Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Cunningham D., Vendrell D. et Múzquiz J.L.** (2006b). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114, p.173-186.
- Banin E., Vassilakos D., Orr E., Martinez R.J. et Rosenberg E.** (2003). Superoxide Dismutase Is a Virulence Factor Produced by the Coral Bleaching Pathogen *Vibrio shiloi*. *Current Microbiology* 46, p.418-422.
- Bao Y., Li L., Xu F. et Zhang G.** (2009). Intracellular copper/zinc superoxide dismutase from bay scallop *Argopecten irradians*: Its gene structure, mRNA expression and recombinant protein. *Fish and Shellfish Immunology* 27, p.210-220.
- Bardy S.L., Ng S.Y. et Jarrell K.F.** (2003). Prokaryotic motility structures. *Microbiology* 149, p.295-304.
- Barrangou R., Briczinski E.P., Traeger L.L., Loquasto J.R., Richards M., Horvath P., Coute-Monvoisin A.-C., Leyer G., Rendulic S., Steele J.L., Broadbent J.R., Oberg T., Dudley E.G., Schuster S., Romero D.A. et Roberts R.F.** (2009). Comparison of the Complete Genome Sequences of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10140 and Bl-04. *J. Bacteriol.* 191, p.4144-4151.
- Bassler B., L., Wright M., Showalter R., E. et Silverman M., R.** (1993). Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Molecular Microbiology* 9, p.773-786.
- Bassler B.L.** (2002). Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* 109, p.421-424.
- Bassler B.L., Greenberg E.P. et Stevens A.M.** (1997). Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology* 179, p.4043-4045.
- Beardmore J.A. et McConnell S.J.** (1998). Genetics and disease resistance in aquaculture. *Journal of Applied Ichthyology* 14, p.167-171.
- Beattie J.H., Chew K.K. et Hershberger W.K.** (1980). Differential survival of selected strains of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during summer mortality. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* 70, p.184-189.
- Baumont A.R. et Fairbrother J.E.** (1991). Ploidy manipulation in molluscan shellfish: a review. *Journal of Shellfish Research* 10, p.1-18.
- Ben-Haim Y., Banim E., Kushmaro A., Loya Y. et Rosenberg E.** (1999). Inhibition of photosynthesis and bleaching of zooxanthellae by the coral pathogen *Vibrio shiloi*. *Environmental Microbiology* 1, p.223-229.
- Ben-Haim Y., Zicherman-Keren M. et Rosenberg E.** (2003). Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Applied and Environmental Microbiology* 69, p.4236-4242.
- Bierne N., Beuzart I., Vonau V., Bonhomme F. et Bédier E.** (2000). Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 184, p.203-219.
- Binesse J.** (2008). Étude de la plasticité génomique de *Vibrio splendidus* et identification de facteurs de virulence. *Thèse de Doctorat*, Université Paris 6 - Pierre et Marie Curie, Paris, 216p.
- Binesse J., Delsert C., Saulnier D., Champomier-Verges M.C., Zagorec M., Munier-Lehmann H., Mazel D. et Le Roux F.** (2008). The metalloprotease Vsm is the main toxic factor for *Vibrio splendidus* extracellular products. *Applied and Environmental Microbiology* 74, p.7108-17.

- Birkbeck T.H.** (2004). Role of probiotics in fish disease prevention. Ed. Leung K.Y., *In Current Trends in the Study of Bacterial and Viral Fish and Shrimp Diseases. Molecular aspects of Fish and Marine Biology. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd*, 390-416p.
- Blanc J., Poisson H. et Vallée F.** (2001). Covariation between diploid and triploid progenies from common breeders in rainbow trout *Onchroyinchus mykiss*. *Aquaculture Research* 32, p.507-516.
- Blocker A., Jouihri N., Larquet E., Gounon P., Ebel F., Parsot C., Sansonetti P. et Allaoui A.** (2001). Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretion. *Molecular Microbiology* 39, p.652-663.
- Bogdan C., Rollinghoff M. et Diefenbach A.** (2000a). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current Opinion in Immunology* 12, p.64-76.
- Bogdan C., Rollinghoff M. et Diefenbach A.** (2000b). The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunological Reviews* 173, p.17-26.
- Boman H.G. et Steiner H.** (1981). Humoral immunity in *Cecropia pupae*. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 95, p.75-91.
- Booth B., Boesman-Finkelstein M. et Finkelstein R.** (1984). *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease nicks cholera enterotoxin. *Infection and Immunity* 45, p.558-560.
- Borrego J.J., Castro D., Luque A., Paillard C., Maes P., Garcia M.T. et Ventosa A.** (1996). *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *International Journal of Systemic Bacteriology* 46, p.480-484.
- Boudry P.** (2009). Genetic variation and selective breeding in hatchery-propagated molluscan shellfish. Ed. Burnell G. et Geoff A., *In New technologies in aquaculture: Improving production efficiency, quality and environmental management. Woodhead Publishing, Australia*. 87-108p.
- Boudry P., Barre M. et Gerard A.** (1998). Genetic improvement and selection in shellfish: a review based on oyster research and production. *Cahiers Options Méditerranéennes (CIHEAM)* 34, p.61-75.
- Boudry P., Dégremont L. et Haffray P.** (2008). The genetic basis of summer mortality in Pacific oyster and potential for improving survival by selective breeding in France. Ed. Samain J.F. et McCombie H., *In Summer mortality of Pacific oyster Crassostrea gigas. The Morest Project. Editions Ifremer/Quae, Paris*. 153-196p.
- Boutet I., Tanguy A. et Moraga D.** (2004). Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329, p.147-157.
- Bowser P.R., Rosemark R. et Reiner C.R.** (1981). A preliminary report of vibriosis in cultured American lobsters, *Homarus americanus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 37, p.80-85.
- Bramble L. et Anderson R.S.** (1997). Modulation of *Crassostrea virginica* hemocyte reactive oxygen species production by *Listonella anguillarum*. *Developmental & Comparative Immunology* 21, p.337-348.
- Bramble L. et Anderson R.S.** (1998). A comparison of the chemiluminescent response of *Crassostrea virginica* and *Morone saxatilis* phagocytes to zymosan and viable *Listonella anguillarum*. *Developmental & Comparative Immunology* 22, p.55-61.
- Brew K., Dinakarpanidian D. et Nagase H.** (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1477, p.267-283.
- Brown J.H.** (1989). Antibiotics: their use and abuse in aquaculture. *World Aquaculture* 20, p.34-49.

-C-

- Cabello F.C.** (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* 8, p.1137-1144.
- Calvo L.M.R., Calvo G.W. et Burreson E.M.** (2003). Dual disease resistance in a selectively bred eastern oyster, *Crassostrea virginica*, strain tested in Chesapeake Bay. *Aquaculture* 220, p.69-87.
- Canesi L., Gallo G., Gavioli M. et Pruzzo C.** (2002). Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique* 57, p.469-476.
- Carballal M.J., Lopez C., Azevedo C. et Villalba A.** (1997). Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 70, p.96-105.
- Caroff M. et Karibian D.** (2003). Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research* 338, p.2431-2447.
- Casadevall A. et Pirofski L.-A.** (1999). Host-Pathogen Interactions: Redefining the Basic Concepts of Virulence and Pathogenicity. *Infection and Immunity* 67, p.3703-3713.
- Casadevall A. et Pirofski L.-A.** (2001). Host-Pathogen Interactions: The Attributes of Virulence. *The Journal of Infectious Diseases* 184, p.337-344.
- Casadevall A. et Pirofski L.-A.** (2003a). The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 1, p.17-24.
- Casadevall A. et Pirofski L.-A.** (2003b). Microbial virulence results from the interaction between host and microorganism. *Trends in Microbiology* 11, p.157-158.
- Casadevall A. et Pirofski L.-A.** (2009). Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework. *Journal of water and health* 7, p.S2-S18.
- Cerenius L. et Soderhall K.** (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews* 198, p.116-126.
- Chan A.B. et Fox J.D.** (1999). NASBA and other transcription-based amplification methods for research and diagnostic microbiology. *Reviews in Medical Microbiology* 10, p.185-196.
- Chan S.S. et Ho K.W.** (1993). Bacterial contamination of the pacific oysters (*Crassostrea gigas*) cultured in deep bay, Hong Kong. *Environmental Technology* 14, p.861 - 867.
- Chavez-Villalba J., Cochard J.-C., Le Pennec M., Barret J., Enriquez-Diaz M. et Caceres-Martinez C.** (2003). Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research* 22, p.721-731.
- Chen C.Y., Wu K.M., Chang Y.C., Chang C.H., Tsai H.C., Liao T.L., Liu Y.M., Chen H.J., Shen A.B., Li J.C., Su T.L., Shao C.P., Lee C.T., Hor L.I. et Tsai S.F.** (2003). Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Research* 13, p.2577-87.
- Cheney D.P., MacDonald B.F. et Elston R.A.** (2000). Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *Journal of Shellfish Research* 19, p.353-359.

- Cheng T.C.** (1981). Bivalves. Ed. Ratcliffe N. et Rowley A., *In Invertebrate Blood Cells. Academic press, London.* 231-300p.
- Cheng T.C.** (1996). Hemocytes: Forms and functions. Ed. Kennedy V.S., Newell R.I.E. et Eble A.F., *In The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant, College Park, MD, USA.* 299-333p.
- Cheng T.C.** (2000). Cellular Defense Mechanisms in Oysters. Ed. Fingerman M. et Nagabhushanam R., *In Recent Advances in Marine Biotechnology, Immunobiology and Pathology. Science Publishers, Enfield (NH, USA) Plymouth (UK).* 43-83p.
- Ching B., Jamieson S., Heath J.W., Heath D.D. et Hubberstey A.** (2009). Transcriptional differences between triploid and diploid Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) during live *Vibrio anguillarum* challenge. *Heredity* 104, p.224.
- Choquet G., Soudant P., Lambert C., Nicolas J.L. et Paillard C.** (2003). Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 57, p.109-116.
- Chourrout D., Chevassus B., Krieg F., Happe A., Burger G. et Renard P.** (1986). Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females — Potential of tetraploid fish. *Theoretical and Applied Genetics* 72, p.193-206.
- Chu F.L.E.** (2000). Defense mechanisms of marine bivalve. Ed. Fingerman M. et Nagabhushanam R., *In Recent Advance in Marine Biotechnology, Immunobiology and Pathology. Science Publishers, Enfield (NH, USA), Plymouth (UK).* 1-42p.
- Chuang Y.C., Sheu H.M., Ko W.C., Chang T.M., Chang M.C. et Huang K.Y.** (1997). Mouse skin damage caused by a recombinant extracellular metalloprotease from *Vibrio vulnificus* and by *V. vulnificus* infection. *Journal of the Formosan Medical Association* 96, p.677-684.
- Clark J.R. et March J.B.** (2006). Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends in Biotechnology* 24, p.212-218.
- Coleman N.** (1986). A review of introductions of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) around the world and a discussion of the possible ecological consequences of introducing the species into Victoria, Australia. *Technical Report.* Marine Wildlife Service, Queenscliff, Australia. 56p.
- Colwell R.R. et Liston J.** (1960a). Microbiology of shellfish. Bacteriological study of the natural flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Applied Microbiology* 8, p.104-9.
- Colwell R.R. et Liston J.** (1960b). Microbiology of shellfish. Bacteriological study of the natural flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Appl Microbiol* 8, p.104-9.
- Comps M., Bonami J.R., Vago C. et Campillo A.** (1976). Une virose de l'huître portugaise *Crassostrea angulata*. *C.R. Académie des Sciences de Paris* 282, p.1991-1993.
- Cong R., Sun W., Liu G., Fan T., Meng X., Yang L. et Zhu L.** (2005). Purification and characterization of phenoloxidase from clam *Ruditapes philippinarum*. *Fish & Shellfish Immunology* 19, p.61-70.
- Cornelis G.R. et Rappuoli R.** (2001). Host-microbe interactions: bacteria: Microbiology will never be the same again. *Current Opinion in Microbiology* 4, p.13.
- Costa M., Prado-Alvarez M., Gestal C., Li H., Roch P., Novoa B. et Figueras A.** (2009). Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria. *Fish & Shellfish Immunology* 26, p.515-523.

- Costa R., Mermoud I., Koblavi S., Morlet B., Haffner P., Berthe F., Legroumellec M. et Grimont P.** (1998). Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture* 164, p.297–309.
- Coster T., Killeen K., Waldor M., Beattie D., Spriggs D., Kenner J., Trofa A., Sadoff J., Mekalanos J. et Taylor D.** (1995). Safety, immunogenicity, and efficacy of live attenuated *Vibrio cholerae* O139 vaccine prototype. *The Lancet* 345, p.949-953.
- Cotter P.A. et Miller J.F.** (1998). *In vivo* and *ex vivo* regulation of bacterial virulence gene expression. *Current Opinion in Microbiology* 1, p.17-26.
- Cottrell M.T. et Kirchman D.L.** (2000). Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 66, p.5116–5122.
- Croci L., Suffredini E., Cozzi L. et Toti L.** (2002). Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Applied Microbiology* 92, p.460-465.
- Crooks J.A.** (2002). Characterizing ecosystem level consequences of biological invasions: the role of ecosystem engineers. *Oikos* 97, p.153-166.
- Crosa J.H.** (1980). A plasmid associated with virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* specifies an ironsequestering system. *Nature* 284, p.566-568.
- Crosa J.H.** (1997). Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61, p.319-336.
- Crosa J.H., Schiewe M.H. et Falkow S.** (1977). Evidence for plasmid contribution to the virulence of fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity* 18, p.509-513.
- Crosbie P.B.B. et Nowak B.F.** (2004). Immune responses of barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), after administration of an experimental *Vibrio harveyi* bacterin by intraperitoneal injection, anal intubation and immersion. *Journal of Fish Diseases* 27, p.623-632.
- Crowther R.S., Roomi N.W., Fahim R.E. et Forstner J.F.** (1987). *Vibrio cholerae* metalloproteinase degrades intestinal mucin and facilitates enterotoxin-induced secretion from rat intestine. *Biochimica et Biophysica Acta* 924, p.393-402.
- Culloty S.C., Cronin M.A. et Mulcahy M.F.** (2004). Potential resistance of a number of populations of the oyster *Ostrea edulis* to the parasite *Bonamia ostreae*. *Aquaculture* 237, p.41-58.

-D-

- Dalhammar G. et Steiner H.** (1984). Characterization of inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects. *European Journal of Biochemistry* 139, p.247-252.
- Daniell S.J., Takahashi N., Wilson R., Friedberg D., Rosenshine I., Booy F.P., Shaw R.K., Knutton S., Frankel G. et Aizawa S.** (2001). The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology* 3, p.865-871.
- Daszak P., Cunningham A.A. et Hyatt A.D.** (2000). Emerging Infectious Diseases of Wildlife-- Threats to Biodiversity and Human Health. *Science* 287, p.443-449.

- Davenel A., Quellec S. et Pouvreau S.** (2006). Noninvasive characterization of gonad maturation and determination of the sex of Pacific oysters by MRI. *Magnetic Resonance Imaging* 24, p.1103-1110.
- Davies J.** (1996). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiologia* 12, p.9-16.
- de Abreu Corrêa A., Albarnaz J.D., Moresco V., Poli C.R., Teixeira A.L., Oliveira Simões C.M. et Monte Barardi C.R.** (2007). Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Marine Environmental Research* 63, p.479.
- De Decker S. et Saulnier D.** (submitted for publication). Evidence of an immediate but short term response of *Crassostrea gigas* oyster induced by virulent or avirulent *Vibrio* bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*.
- De La Peña L.D., Momomaya K., Nakai T. et Muroga K.** (1992). Detection of the causative agent of vibriosis in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathology* 24, p.223-228.
- de Lorgeril J., Gueguen Y., Goarant C., Goyard E., Mugnier C., Fievet J., Piquemal D. et Bachère E.** (2008). A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection. *Molecular Immunology* 45, p.3438-3445.
- Defoirdt T., Boon N., Bossier P. et Verstraete W.** (2004). Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture* 240, p.69-88.
- Defoirdt T., Boon N., Sorgeloos P., Verstraete W. et Bossier P.** (2007). Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in Biotechnology* 25, p.472-479.
- Defoirdt T., Bossier P., Sorgeloos P. et Verstraete W.** (2005). The impact of mutations in the quorum sensing systems of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio harveyi* on their virulence towards gnotobiotically cultured *Artemia franciscana*. *Environmental Microbiology* 7, p.1239-1247.
- Defoirdt T., Crab R., Wood T.K., Sorgeloos P., Verstraete W. et Bossier P.** (2006). Quorum Sensing-Disrupting Brominated Furanones Protect the Gnotobiotic Brine Shrimp *Artemia franciscana* from Pathogenic *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii*, and *Vibrio parahaemolyticus* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 72, p.6419-6423.
- Dégremont L.** (2003). Etude des bases génétiques de la mortalité estivale et des relations avec la croissance chez les juvéniles de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Thèse de Doctorat*, Université de Caen, Basse-Normandie, 333p.
- Dégremont L., Bédier E. et 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, p.21-29.
- Dégremont L., Bédier E., Soletchnik P., Ropert M., Huvet A., Moal J., Samain J.-F. et 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, p.213-229.
- Dégremont L., Ernande B., Bédier E. et Boudry P.** (2007). Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth. *Aquaculture* 262, p.41-53.
- Delaporte M.** (2005). Modulation des paramètres hématocytaires par la nutrition chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Implication dans les mortalités estivales. *Thèse de Doctorat*, Université de Rennes 1, Brest, 365p.
- Delaporte M., Soudant P., Lambert C., Jegaden M., Moal J., Pouvreau S., Dégremont L., Boudry P. et Samain J.-F.** (2007). Characterisation of physiological and immunological differences between Pacific oysters

(*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities and fed different rations under controlled conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 353, p.45-57.

Delaporte M., Soudant P., Lambert C., Moal J., Pouvreau S. et Samain J.-F. (2006). Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture* 254, p.571-582.

Delaporte M., Soudant P., Moal J., Lambert C., Quere C., Miner P., Choquet G., C. P. et J.-F. S. (2003). Effect of a monospecific algal diet on immune functions in two bivalve species-*Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Experimental Biology* 206, p.2053-3064.

DeLong E.F. (2009). The microbial ocean from genomes to biomes. *Nature* 459, p.200.

Delston R., Kothary M., Shangraw K. et Tall B. (2003). Isolation and characterization of a zinc-containing metalloprotease expressed by *Vibrio tubiashii*. *Canadian Journal of Microbiology* 49, p.525-529.

Denkin S.M. et Nelson D.R. (1999). Induction of protease activity in *Vibrio anguillarum* by gastrointestinal mucus. *Applied and Environmental Microbiology* 65, p.3555-3556.

Denkin S.M. et Nelson D.R. (2004). Regulation of *Vibrio anguillarum* empA metalloprotease expression and its role in virulence. *Applied and Environmental Microbiology* 70, p.4193-4204.

DePaola A., Nordstrom J.L., Bowers J.C., Wells J.G. et Cook D.W. (2003). Seasonal Abundance of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama Oysters. *Applied and Environmental Microbiology* 69, p.1521-1526.

Deslous-Paoli J.-M. et Héral M. (1988). Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. *Aquatic Living Resources* 1, p.239-249.

Deslous-Paoli JM., Héral M., Berthomé JP., Razet D. et Garnier J. (1982). Reproduction naturelle de *C. gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron en 1979 et 1981: aspects biochimiques et énergétiques. *Rev Trav Inst Pech Marit* 45, p.319-327.

Dethlefsen L., McFall-Ngai M. et Relman D.A. (2007). An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature* 449, p.811.

Diggles B., Moss G., Carson J. et Anderson C. (2000). Luminous vibriosis in rock lobster *Jasus verreauxi* (Decapoda: Palinuridae) phyllosoma larvae associated with infection by *Vibrio harveyi*. *Diseases of Aquatic Organisms* 43, p.127-137.

Dimarcq J.L. et Hoffmann J. (2001). Peptides antimicrobiens: les antibiotiques du futur? *Biofutur* 212, p.21.

Dimopoulos G., Christophides G.K., Meister S., Schultz J.r., White K.P., Barillas-Mury C. et Kafatos F.C. (2002). Genome expression analysis of *Anopheles gambiae*: Responses to injury, bacterial challenge, and malaria infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, p.8814-8819.

DiSalvo L.H., Blecka J. et Zebal R. (1978). *Vibrio anguillarum* and larval mortality in a california coastal shellfish hatchery. *Applied and Environmental Microbiology* 35, p.219-221.

Dong Y.-H., Gusti A.R., Zhang Q., Xu J.-L. et Zhang L.-H. (2002). Identification of Quorum-Quenching N-Acyl Homoserine Lactonases from *Bacillus* Species. *Applied and Environmental Microbiology* 68, p.1754-1759.

Donnenberg M.S. (2000). Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature* 406, p.768-774.

Doolittle W.F. (1999). Lateral genomics. *Trends in Cell Biology* 9, p.5-8.

Dorsey C.W., Tomaras A.P., Connerly P.L., Tolmasky M.E., Crosa J.H. et Actis L.A. (2004). The siderophore-mediated iron acquisition systems of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Vibrio anguillarum* 775 are structurally and functionally related. *Microbiology* 150, p.3657-3667.

Duan K., Dammel C., Stein J., Rabin H. et Surette M.G. (2003). Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication. *Molecular Microbiology* 50, p.1477-1491.

Duchemin M.B., Fournier M. et Auffret M. (2007). Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 264, p.73-81.

Duperthuy M., Binesse J., Le Roux F., Romestand B., Caro A., Got P., Givaudan A., Mazel D., Bachère E. et Destoumieux-Garzon D. (2010). The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environmental Microbiology* 12, p.951-963.

Dziarski R. (2004). Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Molecular Immunology* 40, p.877-886.

Dziejman M., Serruto D., Tam V.C., Sturtevant D., Diraphat P., Faruque S.M., Rahman M.H., Heidelberg J.F., Decker J., Li L., Montgomery K.T., Grills G., Kucherlapati R. et Mekalanos J.J. (2005). Genomic characterization of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* reveals genes for a type III secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, p.3465-3470.

-E-

Egidius E., Andersen K., Hoff K. et Hjeltnes B. (1981). Cold-water vibriosis or "Hitra disease" in salmonid farming. *Journal of Fish Diseases* 4, p.353-35.

Eiler A., Johansson M. et Bertilsson S. (2006). Environmental Influences on *Vibrio* Populations in Northern Temperate and Boreal Coastal Waters (Baltic and Skagerrak Seas). *Applied and Environmental Microbiology* 72, p.6004-6011.

Elston R. et Leibovitz L. (1980). Pathogenesis of experimental vibriosis in larval american oysters, *Crassostrea virginica*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37, p.964-978.

Elston R.A. (1993). Infectious diseases of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Annual Review of Fish Diseases* 3, p.259-276.

Elston R.A., Hasegawa H., Humphrey K.L. et Polyak I.K. (2008). Re-emergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: severity, environmental drivers, geographic extent and management. *Diseases of Aquatic Organisms* 82, p.119-134.

Embody G.C. et Hyford C.D. (1925). The advantage of rearing brook trout fingerlings from selected breeders. *Transactions of the American Fisheries Society* 55, p.135-138.

Engbrecht J., Neilson K. et Silverman M. (1983). Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell and tissue research* 32, p.773-781.

Enriquez-Díaz M., Pouvreau S., Chávez-Villalba J. et Le Pennec M. (2009). Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquaculture International* 17, p.491-506.

Ernande B. (2001). Développement, plasticité phénotypique et évolution. *Thèse de Doctorat*, Université de La Rochelle, 274p.

Ernande B., Boudry P., Clobert J. et Haure J. (2004). Plasticity in resource allocation based life history traits in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Spatial variation in food abundance. *Journal of Evolutionary Biology* 17, p.342-356.

-F-

Fabioux C. (2004). Origine et développement des cellules germinales chez l'huître *Crassostrea gigas*: Intérêt pour le contrôle de la reproduction en éclosion. *Thèse de Doctorat*, Université de Bretagne Occidentale, Brest, 193p.

Fabioux C., Huvet A., Le Souchu P., Le Pennec M. et Pouvreau S. (2005). Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 250, p.458-470.

Falkow S. (1988). Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Reviews of Infectious Diseases* 10, p.S274-6.

FAO (2009). The State of World Fisheries and Aquaculture 2008. *FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS* Fisheries and Aquaculture Department, p.216.

Farley C.A., Lewis E.J., Relyea D., Zahtila J. et Rivara G. (1997). Juvenile oyster disease resistance studies: 1994-1996. *Journal of Shellfish Research* 16, p.331.

Farley C.A., Lewis E.J., Relyea D., Zahtila J. et Rivara G. (1998). Resistance studies for juvenile oyster disease (JOD) 1997: Some early insights into genetic aspects. *Journal of Shellfish Research* 17, p.352-353.

Farto R., Armada S.P., Montes M., Guisande J.A., Pérez M.J. et Nieto T.P. (2003). *Vibrio lentus* associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*). *Journal of Invertebrate Pathology* 83, p.149-156.

Farto R., Montes M., Perez M.J., Nieto T.P., Larsen J.L. et Pedersen K. (1999). Characterization by numerical taxonomy and ribotyping of *Vibrio splendidus* biovar I and *Vibrio scophthalmi* strains associated with turbot cultures. *Journal of Applied Microbiology* 86, p.796-80.

Faury N., Saulnier D., Thompson F.L., Gay M., Swings J. et Le Roux F. (2004). *Vibrio crassostreae* sp. nov., isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*). *Int J Syst Evol Microbiol* 54, p.2137-40.

Feng S.Y. (1988). Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. *American Fisheries Society Special Publication* 18, p.153-168.

Finlay B.B. et Falkow S. (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61, p.136-169.

Fischetti V.A., Nelson D. et Schuch R. (2006). Reinventing phage therapy: are the parts greater than the sum? *Nature Biotechnology* 24, p.1508-1511.

Fisher S.W. (1986). Structure and functions of oyster hemocytes. *Immunity in Invertebrates* 3, p.25-35.

Fleury E., Huvet A., Lelong C., de Lorgeril J., Boulo V., Gueguen Y., Bachere E., Tanguy A., Moraga D., Fabioux C., Lindeque P., Shaw J., Reinhardt R., Prunet P., Davey G., Lapegue S., Sauvage C., Corporeau C., Moal J., Gavory F., Wincker P., Moreews F., Klopp C., Mathieu M., Boudry P. et Favrel P. (2009a). Generation and analysis of a 29,745 unique Expressed Sequence Tags from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase. *BMC Genomics* 10, p.341.

Fleury E., Moal J., Boulo V., Daniel J.-Y., Mazurais D., Hénaut A., Corporeau C., Boudry P., Favrel P. et Huvet A. (2009b). Microarray-Based Identification of Gonad Transcripts Differentially Expressed Between

Lines of Pacific Oyster Selected to Be Resistant or Susceptible to Summer Mortality. *Marine Biotechnology* 12, p.326-339.

Fleury P.G., Goyard E., Mazurie J., Claude S., Bouget J.F., Langlade A. et Le Cognic Y. (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, p.195–208.

Flye Sainte Marie J. (2007). Approche écophysiologique de la Maladie de l'Anneau Brun chez la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*: expérimentations et modélisation. *Thèse de Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale*, 150p.

Ford S.E. et Haskin H.H. (1987). Infection and Mortality Patterns in Strains of Oysters *Crassostrea virginica* Selected for Resistance to the Parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX). *The Journal of Parasitology* 73, p.368-376.

Forrest B.M., Keeley N.B., Hopkins G.A., Webb S.C. et Clement D.M. (2009). Bivalve aquaculture in estuaries: Review and synthesis of oyster cultivation effects. *Aquaculture* 298, p.1-15.

Foster J.S., Apicella M.A. et McFall-Ngai M.J. (2000). *Vibrio fischeri* lipopolysaccharide induces developmental apoptosis, but not complete morphogenesis, of the *Euprymna scolopes* symbiotic light organ. *Developmental Biology* 226, p.242-254.

François C., Garcia C., Arzul I., Joly J.-P., Miossec L., Chollet B., Ferrand S., Robert M., Tourbiez D., Omnes E., Cobret L., Faury N., Haffner P., Saulnier D., Pépin S., Renault T. et coll. (2009a). Bilan 2008 du réseau REPAMO. *Rapport Interne Ifremer* p.45.

François C., Joly J.-P., Garcia C., Miossec L., Arzul I., Robert M., Omnes E., Chollet B. et Renault T. (2009b). Le réseau REPAMO: un outil de surveillance de la santé des mollusques marins élevés et sauvages. *Epidémiologie et Santé Animale* p.8.

François C., Joly J.-P., Garcia C., Miossec L., Saulnier D., Pépin J., Arzul I., Omnes E., Tourbiez D., Faury N., Haffner P., Chollet B., Robert M., Cobret L., Renault T. et Coll. (2010). Bilan 2009 du réseau REPAMO. *Rapport Interne Ifremer* p.45.

Fuller R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66, p.365-378.

Fullner K.J. et Mekalanos J.J. (2000). *In vivo* covalent cross-linking of cellular actin by the *Vibrio cholerae* RTX toxin. *Embo J* 19, p.5315-5323.

Fuqua C. et Greenberg E.P. (1998). Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Current Opinion in Microbiology* 1, p.183-189.

Furuya E.Y. et Lowy F.D. (2006). Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature Reviews Microbiology* 4, p.36-45.

-G-

Gagnaire B., Frouin H., Moreau K., Thomas-Guyon H. et Renault T. (2006a). Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish & Shellfish Immunology* 20, p.536-547.

Gagnaire B., Gay M., Huvet A., Daniel J.-Y., Saulnier D. et Renault T. (2007). Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: *In vivo* effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic Toxicology* 84, p.92-102.

- Gagnaire B., Soletchnik P., Madec P., Geairon P., Le Moine O. et Renault T.** (2006b). Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: Difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. *Aquaculture* 254, p.606-616.
- Gagnaire B., Thomas-Guyon H., Burgeot T. et Renault T.** (2006c). Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biology and Toxicology* 22, p.1-14.
- Gagnaire B., Thomas-Guyon H. et Renault T.** (2004). In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 16, p.501-512.
- Garcia-Vallve S., Guzman E., Montero M.A. et Romeu A.** (2003). HGT-DB: a database of putative horizontally transferred genes in prokaryotic complete genomes. *Nucleic Acids Research* 31, p.187-189.
- Gardel C.L. et Mekalanos J.J.** (1996). Alterations in *Vibrio cholerae* motility phenotypes correlate with changes in virulence factor expression. *Infection and Immunity* 64, p.2246-2255.
- Garnier-Géré P.H., Naciri-Graven Y., Bougrier S., Magoulas A., Héral M., Kotoulas G., Hawkins A. et Gérard A.** (2002). Influences of triploidy, parentage and genetic diversity on growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* reared in contrasting natural environments. *Molecular Ecology* 11, p.1499-1514.
- Garnier M., Labreuche Y., Garcia C., Robert M. et Nicolas J.L.** (2007). Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microbial Ecology* 53, p.187-196.
- Gatesoupe F.J.** (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180, p.147-165.
- Gatesoupe F.J.** (2002). Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia* nauplii as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquaculture* 22, p.347-360.
- Gatesoupe F.J., Lambert C. et Nicolas J.L.** (1999). Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Journal of Applied Microbiology* 87, p.757-763.
- Gay M.** (2004). Infection expérimentale chez *Crassostrea gigas*: étude de deux souches pathogènes apparentées à *Vibrio splendidus*. *Thèse de Doctorat*, Université de La Rochelle, 179p.
- Gay M., Berthe F.C. et Le Roux F.** (2004a). Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* 59, p.49-56.
- Gay M., Renault T., Pons A.M. et Le Roux F.** (2004b). Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Diseases of Aquatic Organisms* 62, p.65-74.
- Ghosh S., May M.J. et Kopp E.B.** (1998). NF- κ B and Rel proteins: Evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annual Review in Immunology* 16, p.225-260.
- Ginn B.R.** (in press). The implications of gene heterozygosity for protein folding and protein turnover. *Journal of Theoretical Biology*.
- Glude J.B.** (1975). A summary report of Pacific coast oyster mortality investigations 1965-1972. *Proceedings of the Third U.S.-Japan Meeting on Aquaculture*, Tokyo, Japan: 1-28.p.
- Goarant C., Ansquer D., Herlin J., Domalain D., Imbert F. et De Decker S.** (2006a). "Summer Syndrome" in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture* 253, p.105-113.
- Goarant C., Herlin J., Brizard R., Marteau A., Martin C. et Martin B.** (2000). Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 40, p.101-107.

- Goarant C., Merien F., Berthe F., Mermoud I. et Perolat P.** (1999). Arbitrarily Primed PCR to type *Vibrio* spp. pathogenic for shrimp. *Applied and Environmental Microbiology* 65, p.1145-1151.
- Goarant C., Régnier F., Brizard R. et Marteau A.-L.** (1998). Acquisition of susceptibility to *Vibrio penaeicida* in *Penaeus stylirostris* postlarvae and juveniles. *Aquaculture* 169, p.291-296.
- Goarant C., Reynaud Y., Ansquer D., De Decker S. et Merien F.** (2007). Sequence polymorphism-based identification and quantification of *Vibrio nigripulchritudo* at the species and subspecies level targeting an emerging pathogen for cultured shrimp in New Caledonia. *Journal of Microbiological Methods* 70, p.30-38.
- Goarant C., Reynaud Y., Ansquer D., De Decker S., Saulnier D. et Roux F.I.** (2006b). Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. *Systematic and Applied Microbiology* 29, p.570-580.
- Gómez-Díaz E.** (2009). Linking questions to practices in the study of microbial pathogens: Sampling bias and typing methods. *Infection, Genetics and Evolution* 9, p.1418.
- Gomez-Gil B., Roque A. et Turnbull J.** (2000). The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191, p.259-270.
- Gomez-Leon J., Villamil L., Salger S.A., Sallum R.H., Remacha-Trivino A., Leavitt D.F. et Gomez-Chiarri M.** (2008). Survival of eastern oysters *Crassostrea virginica* from three lines following experimental challenge with bacterial pathogens. *Diseases of Aquatic Organisms* 79, p.95-105.
- Gomez D.E., Alonso D.F., Yoshiji H. et Thorgeirsson U.P.** (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *European Journal of Cell Biology* 74, p.111-122.
- Gonzalez M., Gueguen Y., Desserre G., de Lorgeril J., Romestand B. et Bachere E.** (2007a). Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* 31, p.332-9.
- Gonzalez M., Gueguen Y., Desserre G., de Lorgeril J., Romestand B. et Bachere E.** (2007b). Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology* 31, p.332-9.
- Gonzalez M., Gueguen Y., Destoumieux-Garzon D., Romestand B., Fievet J., Pugnieri M., Roquet F., Escoubas J.-M., Vandenbulcke F., Levy O., Saune L., Bulet P. et Bachere E.** (2007c). Evidence of a bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the *Crassostrea gigas* Cg-BPI. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 144, p.17759-17764.
- Gonzalez M., Romestand B., Fievet J., Huvet A., Lebart M.-C., Gueguen Y. et Bachère E.** (2005). Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338, p.1089-1097.
- Gouletquer P., Soletchnik P., Le Moine O., Razet D., Geairon P. et Faury N.** (1998). Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oleron (France). *Counc. Meet. of the Int. Counc. for the Exploration of the Sea*, Cascais (Portugal), 16-19 Sep 1998, Cascais (Portugal), 16-19 Sep 1998: 20p.
- Goyard E., Goarant C., Ansquer D., Brun P., De Decker S., Dufour R., Galinié C., Peignon J.-M., Pham D., Vourey E., Harache Y. et Patrois J.** (2008). Cross breeding of different domesticated lines as a simple way for genetic improvement in small aquaculture industries: Heterosis and inbreeding effects on growth and survival rates of the Pacific blue shrimp *Penaeus (Litopenaeus) stylirostris*. *Aquaculture* 278, p.43-50.
- Goyard E., Peignon J.M., Vonau V., Goarant C., Imbert F., Pham D. et Patrois J.** (2004). Genetic improvement of pacific Blue Shrimp addresses Syndrome 93 in New Caledonia. *Global Aquaculture Advocate* 7, p.86-87.

- Gravato-Nobre M.J. et Hodgkin J.** (2005). *Caenorhabditis elegans* as a model for innate immunity to pathogens. *Cellular Microbiology* 7, p.741-751.
- Green T.J. et Barnes A.C.** (2009). Inhibitor of REL/NF- κ B 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 Immunology* 27, p.260-265.
- Griesch J., Wedde M. et Vilcinskis A.** (2000). Recognition and regulation of metalloproteinase activity in the haemolymph of *Galleria mellonella*: a new pathway mediating induction of humoral immune responses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, p.461-472.
- Griffiths G.L., Sigel S.P., Payne S.M. et Neilands J.B.** (1984). Vibriobactin, a siderophore from *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem* 259, p.383-385.
- Grizel H.** (1974). Etude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate. *C.R. Académie des Sciences de Paris* 279, p.783-785.
- Grizel H.** (1996). Some examples of the introduction and transfer of mollusk populations. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties* 15, p.401-408.
- Guan Y., Yu Z. et Li C.** (2003). The effect of temperature on white spot syndrome infections in *Marsupenaeus japonicus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 83, p.257-260.
- Gudding R., Lillehaug A. et Evensen Ø.** (1999). Recent developments in fish vaccinology. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 72, p.203-212.
- Gueguen Y., Bernard R., Julie F., Paulina S., Delphine D.-G., Franck V., Philippe B. et Evelyne B.** (2009). Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin. *Molecular Immunology* 46, p.516-522.
- Gueguen Y., Cadoret J.-P., Flament D., Barreau-Roumiguier C., Girardot A.-L., Garnier J., Hoareau A., Bachere E. et Escoubas J.-M.** (2003). Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 303, p.139-145.
- Gueguen Y., Herpin A., Aumelas A., Garnier J., Fievet J., Escoubas J.-M., Bulet P., Gonzalez M., Lelong C., Favrel P. et Bachere E.** (2005). Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*. Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities and gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 281, p.313-23.
- Gueguen Y., Herpin A., Aumelas A., Garnier J., Fievet J., Escoubas J.M., Bulet P., Gonzalez M., Lelong C., Favrel P. et Bachere E.** (2006). Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*. Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression. *J Biol Chem* 281, p.313-23.
- Guiney D.G.** (1997). Regulation of bacterial virulence gene expression by the host environment. *Journal of Clinical Investigation* 99, p.565-569.
- Guisande J.A., Montes M., Farto R., Armada S.P., Perez M.J. et Nieto T.P.** (2004). A set of tests for the phenotypic identification of culturable bacteria associated with Galician bivalve mollusc production. *Journal of Shellfish Research* 3, p.599-609.
- Guisande J.A., Perez Lago E., Prado S., Nieto T.P. et Farto Seguin R.** (2008). Genotypic diversity of culturable *Vibrio* species associated with the culture of oysters and clams in Galicia and screening of their pathogenic potential. *Journal of Shellfish Research* 27, p.801-809.
- Guo X., Ford S.E., DeBrosse G. et Smolowitz R.** (2003). Breeding and evaluation of eastern oyster strains selected for MSX, dermo and JOD resistance. *Journal of Shellfish Research* 22, p.333-334.

Guo X., Hedgecock D., Hershberger W., Cooper K. et Allen S. (1998). Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Evolution* 52, p.394-402.

-H-

Hada H.S., West P.A., Lee J.V., Stemmler J. et Colwell R.R. (1984). *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve molluscs. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34, p.1-4.

Hagstrom A., Pommier T., Rohwer F., Simu K., Stolte W., Svensson D. et Zweifel U.L. (2002). Use of 16S ribosomal DNA for delineation of marine bacterioplankton species. *Applied and Environmental Microbiology* 68, p.3628-33.

Haine E.R. (2008). Symbiont-mediated protection. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275, p.353-361.

Hanlon R.T., Forsythe J.W., Cooper K.M., Dinuzzo A.R., Folse D.S. et Kelly M.T. (1984). Fatal penetrating skin ulcers in laboratory-reared octopuses. *Journal of Invertebrate Pathology* 44, p.67-83.

Hardy S.W., Fletcher T.C. et Olafsen J.A. (1977). Aspects of cellular and humoral defence mechanisms in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Developmental Immunobiology* 5, p.59-66.

Hare P., Long S., Robb F.T. et Woods D.R. (1981). Regulation of exoprotease production by temperature and oxygen in *Vibrio alginolyticus*. *Archives of Microbiology* 130, p.276-280.

Harris-Young L., Tamplin M.L., Mason J.W., Aldrich H.C. et Jackson J.K. (1995). Viability of *Vibrio vulnificus* in Association with Hemocytes of the American Oyster (*Crassostrea virginica*). *Applied and Environmental Microbiology* 61, p.52-57.

Harvell C.D., Kim K., Burkholder J.M., Colwell R.R., Epstein P.R., Grimes D.J., Hofmann E.E., Lipp E.K., Osterhaus A.D., Overstreet R.M., Porter J.W., Smith G.W. et Vasta G.R. (1999). Emerging Marine Diseases--Climate Links and Anthropogenic Factors. *Science* 285, p.1505-1510.

Harvell C.D., Mitchell C.E., Ward J.R., Altizer S., Dobson A.P., Ostfeld R.S. et Samuel M.D. (2002). Climate Warming and Disease Risks for Terrestrial and Marine Biota. *Science* 296, p.2158-2162.

Harvell D. (2004). Ecology and Evolution of Host-Pathogen Interactions in Nature. *The American Naturalist* 164, p.S1.

Hase C.C. et Finkelstein R.A. (1991). Cloning and nucleotide sequence of the *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease (HA/protease) gene and construction of an HA/protease-negative strain. *Journal of Bacteriology* 173, p.3311-3317.

Haskin H.H. et Ford S.E. (1979). Development of resistance to *Minchinia nelsoni* (MSX) mortality in laboratory-reared and native oyster stocks in Delaware Bay. *Marine Fisheries Review* Janv-Feb 1979, p.54-63.

Hawkins A., Magoulas A., Héral M., Bougrier S., Naciri-Graven Y., Day A.J. et Kotoulas G. (2000). Separate effects of triploidy, parentage and genomic diversity upon feeding behaviour, metabolic efficiency and net energy balance in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetical Research* 76, p.273-284.

Hearing V.J. et Tsukamoto K. (1991). Enzymatic control of pigmentation in mammals. *Faseb Journal* 5, p.2902-2909.

Heidelberg J.F., Eisen J.A., Nelson W.C., Clayton R.A., Gwinn M.L., Dodson R.J., Haft D.H., Hickey E.K., Peterson J.D., Umayam L., Gill S.R., Nelson K.E., Read T.D., Tettelin H., Richardson D., Ermolaeva

- M.D., Vamathevan J., Bass S., Qin H., Dragoi I., Sellers P., McDonald L., Utterback T., Fleishmann R.D., Nierman W.C., White O., Salzberg S.L., Smith H.O., Colwell R.R., Mekalanos J.J., Venter J.C. et Fraser C.M.** (2000). DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406, p.477-83.
- Hellio C., Bado-Nilles A., Gagnaire B., Renault T. et 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 Immunology* 22, p.433-440.
- Hellyer T.J.** (2001). Detection of viable *Mycobacterium tuberculosis* by reverse transcriptase-strand displacement amplification of mRNA. *Methods in Molecular Medicine* 48, p.141-155.
- Hellyer T.J., DesJardin L.E., Hehman G.L., Cave M.D. et Eisenach K.D.** (1999). Quantitative analysis of mRNA as a marker for viability of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 37, p.290-295.
- Henke J.M. et Bassler B.L.** (2004a). Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology* 186, p.3794-3805.
- Henke J.M. et Bassler B.L.** (2004b). Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology* 186, p.6902-6914.
- Hentzer M. et Givskov M.** (2003). Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *The Journal of Clinical Investigation* 112, p.1300-07.
- Héral M.** (1985). L'ostréiculture française traditionnelle. *Aquaculture, Lavoisier (Paris)* p.50.
- Hine P.M.** (1999). The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology* 9, p.367-385.
- Hoffmann J.A., Kafatos J.C., Janeway C.A., Jr., et Ezekowitz R.A.B.** (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, p.1313-1318.
- Hoffmann J.A. et Reichhart J.M.** (2002). Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature Immunology* 3, p.121-126.
- Hopkins C.** (2001). A review of introductions and transfers of alien marine species in the North Sea Area. *Report to Directorate for Nature Management*. Oslo, Norway. 96p.
- Horowitz A. et Horowitz S.** (2001). Disease control in shrimp aquaculture from a microbial ecology perspective. *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001* p.199-218.
- Howland K.H. et Cheng T.C.** (1982). Identification of bacterial chemoattractants for oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology* 39, p.123-130.
- Hueck C.J.** (1998). Type III Protein Secretion Systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, p.379-433.
- Hulata G.** (2001). Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica* 111, p.155-173.
- Huvet A., Herpin A., Dégremont L., Labreuche Y., Samain J.-F. et 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, p.211-220.
- Huvet A., Normand J., Fleury E., Quillien V., Fabioux C. et Boudry P.** (2010). Reproductive effort of Pacific oysters: A trait associated with susceptibility to summer mortality. *Aquaculture* 304, p.95-99.

-IJK-

- Igbinosa E.O. et Okoh A.I.** (2008). Emerging *Vibrio* species: an unending threat to public health in developing countries. *Research in Microbiology* 159, p.495-506.
- Imai T., Numachi K.I., Oizumi J. et 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. *Bulletin of Tohoku Regional Fisheries Research Laboratory* 25, p.27-38.
- Irianto A. et Austin B.** (2002). Review probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases* 25, p.633.
- Jeffries V.E.** (1982). Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 29, p.201-226.
- Jobling M. et Holmes R.** (1997). Characterization of hapR, a positive regulator of the *Vibrio cholerae* HA/protease gene hap, and its identification as a functional homologue of the *Vibrio harveyi* luxR gene. *Molecular Microbiology* 26, p.1023-34.
- Johnson J.A., Panigrahi P. et Morris J.G.J.** (1992). Non-O1 *Vibrio cholerae* NRT36S produces a polysaccharide capsule that determines colony morphology, serum resistance, and virulence in mice. *Infection and Immunity* 60, p.864-869.
- Jorgensen T., Midling K., Espelid S., Nilsen R. et Stensvag K.** (1989). *Vibrio salmonicida*, previously registered as a pathogen in salmonids, does also cause mortality in netpen captured cod (*Gadus morhua*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 9, p.42-43.
- Joseph L.A. et Wright A.C.** (2004). Expression of *Vibrio vulnificus* Capsular Polysaccharide Inhibits Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology* 186, p.889-893.
- Kaper J., Baldini H.L.M. et Levine M.** (1984). Recombinant nontoxinogenic *Vibrio cholerae* strains as attenuated cholera vaccine candidates. *Nature* 308, p.655-658.
- Kaprelyants A.S. et Kell D.B.** (1996). Do bacteria need to communicate with each other for growth? *Trends Microbiol* 4, p.237-242.
- Karaolis D.K., Johnson J.A., Bailey C.C., Boedeker E.C., Kaper J.B. et Reeves P.R.** (1998). A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *PNAS* 95, p.3134-3139.
- Karunasagar I., Shivu M.M., Girisha S.K., Krohne G. et Karunasagar I.** (2007). Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. *Aquaculture* 268, p.288-292.
- Keller L. et Surette M.G.** (2006). Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology* 4, p.249-258.
- Kelly M. et Stroh E.** (1988). Occurrence of *Vibrionaceae* in natural and cultivated oyster populations in the Pacific Northwest. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 9, p.1-5.
- Kesarcodi-Watson A., Kaspar H., Lategan J. et Gibson L.** (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274, p.1-14.
- Keys S.J., Crocos P.J., Burrridge C.Y., Coman G.J., Davis G.P. et Preston N.P.** (2004). Comparative growth and survival of inbred and outbred *Penaeus (marsupenaeus) japonicus*, reared under controlled environment conditions: indications of inbreeding depression. *Aquaculture* 241, p.151-168.

- Kim M.C., Cho S.M. et Jeong W.G.** (2007). Short-term physiological response of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, on exposure to varying levels of polycyclic aromatic hydrocarbon. *Aquaculture Research* 38, p.1612-1618.
- Kita-Tsukamoto K., Oyaizu H., Nanba K. et Simidu U.** (1993). Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family *Vibrionaceae*, determined on the basis of 16S rRNA sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43, p.8-19.
- Koganezawa A.** (1974). Present status of studies on the mass mortality of cultured oysters in Japan and its prevention. *Proceedings of the Third U.S.-Japan Meeting on Aquaculture*, Tokyo, Japan, October 15-16: 29-34p.
- Kooijman S.A.L.M.** (2000). Dynamic energy and mass budgets in biological systems. Ed. Cambridge University Press. *Cambridge University Press, Cambridge, UK*. 424p.
- Kotewicz M.L., Mammel M.K., LeClerc J.E. et Cebula T.A.** (2008). Optical mapping and 454 sequencing of *Escherichia coli* O157: H7 isolates linked to the US 2006 spinach-associated outbreak. *Microbiology* 154, p.3518-3528.
- Kovach M.E., Shaffer M.D. et Peterson K.M.** (1996). A putative integrase gene defines the distal end of a large cluster of ToxR-regulated colonization genes in *Vibrio cholerae*. *Microbiology* 142, p.2165-2174.
- Krause R.M.** (1998). Emerging Infections. Ed. *Academic Press, New York*. 513p.
- Kubori T., Matsushima Y., Nakamura D., Uralil J., Lara-Tejero M., Sukhan A., Galan J.E. et Aizawa S.I.** (1998). Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* 280, p.602-605.
- Kurz C.L. et Ewbank J.J.** (2003). *Caenorhabditis elegans*: an emerging genetic model for the study of innate immunity. *Nature Reviews Genetics* 4, p.380-390.
- L-
- La Valley K.J., Jones S., Gomez-Chiarri M., Dealeris J. et Rice M.** (2009). Bacterial community profiling of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*): comparison of culture-dependent and culture-independent outcomes. *Journal of Shellfish Research* 28, p.827-835.
- Labreuche Y.** (2006). Caractérisation de la virulence d'une souche de *Vibrio aestuarianus*, pathogène de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Thèse de Doctorat*, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France, 277p.
- Labreuche Y., Lambert C., Soudant P., Boulo V., Huvet A. et Nicolas J.L.** (2006a). Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes and Infection* 8, p.2715-24.
- Labreuche Y., Soudant P., Goncalves M., Lambert C. et Nicolas J.L.** (2006b). Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology* 30, p.367-79.
- Lacoste A., Jalabert F., Malham S., Cueff A., Gelebart F., Cordevant C., Lange M. et 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). *Diseases of Aquatic Organisms* 46, p.139-45.

- Lallias D., Arzul I., Heurtebise S., Ferrand S., Chollet B., Robert M., Beaumont A.R., Boudry P., Morga B. et Lapègue S.** (2008). Bonamia ostreae-induced mortalities in one-year old European flat oysters *Ostrea edulis*: experimental infection by cohabitation challenge. *Aquatic Living Resources* 21, p.423-439.
- Lallias D., Gomez-Raya L., Haley C., Arzul I., Heurtebise S., Beaumont A., Boudry P. et Lapègue S.** (2009). Combining Two-Stage Testing and Interval Mapping Strategies to Detect QTL for Resistance to Bonamiosis in the European Flat Oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biotechnology* 11, p.570-584.
- Lambert C.** (1998). Etude des infections à *Vibrionaceae* chez les mollusques bivalves, à partir d'un modèle larves de *Pecten maximus*. *Thèse de Doctorat*, Université de Bretagne Occidentale, 182p.
- Lambert C., Moal J., Le Moullac G. et Pouvreau S.** (2008). Les risques associés à la physiologie de l'huître en période de reproduction. Ed. Samain J. et McCombie H., *In* Mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Défi Morest. *Ifremer/Quae, Paris*. 153-196p.
- Lambert C. et Nicolas J.L.** (1998). Specific inhibition of chemiluminescent activity by pathogenic vibrios in hemocytes of two marine bivalves: *Pecten maximus* and *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology* 71, p.53-63.
- Lambert C., Nicolas J.L., Cilia V. et Corre S.** (1998). *Vibrio pectenecida* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, p.481-487.
- Lambert C., Soudant P., Choquet G. et Paillard C.** (2003). Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish & Shellfish Immunology* 15, p.225-240.
- Lan R. et Reeves P.** (1996). Gene transfer is a major factor in bacterial evolution. *Molecular Biology and Evolution* 13, p.47-55.
- Lane E. et Birkbeck T.H.** (1999). Toxicity of bacteria towards haemocytes of *Mytilus edulis*. *Aquatic Living Resources* 12, p.343-350.
- Lango-Reynoso F.** (1999). Détermination de la sexualité chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Thèse de Doctorat*, Université de Bretagne Occidentale, Brest, 139p.
- Lango-Reynoso F., Chávez-Villalba J., Cochard J.C. et Le Pennec M.** (2000). Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 190, p.183-199.
- Lapègue S., Bédier E., Goyard E., Dégremont L., Baud J.P., Gérard A., Gouletquer P. et Boudry P.** (2004). Apport d'un programme de génétique à une filière de production aquacole: l'exemple de l'ostréiculture. Ed. *In* Styli 2003, Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. *Actes de colloque, IFREMER*, 113-121p.
- Latreille P., Norton S., Goldman B., Henkhaus J., Miller N., Barbazuk B., Bode H., Darby C., Du Z., Forst S., Gaudriault S., Goodner B., Goodrich-Blair H. et Slater S.** (2007). Optical mapping as a routine tool for bacterial genome sequence finishing. *BMC Genomics* 8, p.321.
- Launey S. et Hedgecock D.** (2001). High genetic load in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics* 159, p.255-265.
- Le Deuff R., Nicolas J.L., Renault T. et Cochenec N.** (1994). Experimental transmission of herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 142, p.69-72.
- Le Roux F. et Austin B.** (2006). *Vibrio splendidus*. Ed. Thompson F.L., Austin B. et Swings J., *In* The Biology of Vibrios. *ASM Press, Washington, DC*. 285-296p.

- Le Roux F., Binesse J., Saulnier D. et Mazel D.** (2007). Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counterselectable suicide vector. *Applied and Environmental Microbiology* 73, p.777-84.
- Le Roux F., Gay M., Lambert C., Nicolas J.L., Gouy M. et Berthe F.** (2004). Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences. *Diseases of Aquatic Organisms* 58, p.143-50.
- Le Roux F., Gay M., Lambert C., Waechter M., Poubalanne S., Chollet B., Nicolas J.L. et Berthe F.** (2002). Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic Living Resources* 15, p.251-258.
- Le Roux F., Goubet A., Thompson F.L., Faury N., Gay M., Swings J. et Saulnier D.** (2005). *Vibrio gigantis* sp. nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*). *Int J Syst Evol Microbiol* 55, p.2251-5.
- Le Roux F., Mohamed Z., Chakroun N., Binesse J., Saulnier D., Bouchier C., Zidane N., Ma L., Rusniok C., Lajus A., Buchrieser C., Médigue C., Polz M.F. et Mazel D.** (2009). Genome sequence of *Vibrio splendidus*: an abundant planctonic marine species with a large genotypic diversity. *Environmental Microbiology* 11, p.1959-1970.
- Leadbetter J.R. et Greenberg E.P.** (2000). Metabolism of Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals by *Variovorax paradoxus*. *Journal of Bacteriology* 182, p.6921-6926.
- Leclerc V. et Reichhart J.M.** (2004). The immune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunological Reviews* 198, p.59-71.
- Lee J.-H., Rho J.B., Park K.-J., Kim C.B., Han Y.-S., Choi S.H., Lee KH et SJ. P.** (2004a). Role of Flagellum and Motility in Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Infection and Immunity* 72, p.4905-4910.
- Lee K.K., Yang T.I., Liu P.C., Wu J.L. et Hsu Y.L.** (1999). Dual challenges of infectious pancreatic necrosis virus and *Vibrio carchariae* in the grouper, *Epinephelus* sp. *Virus Research* 63, p.131-134.
- Lee K.K., Yu S.R. et Liu P.C.** (1997). Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Current Microbiology* 34, p.110-117.
- Lee S.E., Ryu P.Y., Kim S.Y., Kim Y.R., Koh J.T., Kim O.J., Chung S.S., Choy H.E. et Rhee J.H.** (2004b). Production of *Vibrio vulnificus* hemolysin *in vivo* and its pathogenic significance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324, p.86-91.
- Leeds T.D., Silverstein J.T., Weber G.M., Vallejo R.L., Palti Y., Rexroad C.E., III, Evenhuis J., Hadidi S., Welch T.J. et Wiens G.D.** (in press). Response to selection for bacterial cold water disease resistance in rainbow trout. *Journal of Animal Science*.
- Lemonnier H.** (2007). Effet des conditions environnementales sur le développement des pathologies à *Vibrio* dans les élevages de crevettes en Nouvelle-Calédonie. *Thèse de Doctorat*, Université de La Rochelle, 204p.
- Li T., Ding M., Zhang J., Xiang J. et Liu R.** (1998). Studies on the pustule disease of abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) on the Dalian coast. *Journal of Shellfish Research* 17, p.707-711.
- Li Y., Qin J.G., Li X. et Benkendorff K.** (2009a). Monthly variation of condition index, energy reserves and antibacterial activity in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in Stansbury (South Australia). *Aquaculture* 286, p.64-71.
- Li Y., Qin J.G., Li X. et Benkendorff K.** (2009b). Spawning-dependent stress response to food deprivation in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 286, p.309-317.

- Lightner D.V. et Redman R.M.** (1994). An epizootic of necrotizing hepatopancreatitis in cultured penaeid shrimp in northwestern Peru. *Aquaculture* 122, p.9-18.
- Lightner D.V. et Redman R.M.** (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* 164, p.201-220.
- Lilley B., N. et Bassler B., L.** (2000). Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and Sigma-54. *Molecular Microbiology* 36, p.940-954.
- Lilley D.M. et Stillwell R.J.** (1965). Probiotics: growth promoting factors produced by micro-organisms. *Science* 147, p.747-748.
- Lin J.H.-Y., Chen T.-Y., Chen M.-S., Chen H.-E., Chou R.-L., Chen T.-I., Su M.-S. et Yang H.-L.** (2006). Vaccination with three inactivated pathogens of cobia (*Rachycentron canadum*) stimulates protective immunity. *Aquaculture* 255, p.125.
- Lin W., Fullner K.J., Clayton R., Sexton J.A., Rogers M.B., Calia K.E., Calderwood S.B., Fraser C. et Mekalanos J.J.** (1999). Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, p.1071-1076.
- Lin W., Kovacikova G. et Skorupski K.** (2007). The quorum sensing regulator HapR downregulates the expression of the virulence gene transcription factor AphA in *Vibrio cholerae* by antagonizing Lrp- and VpsR-mediated activation. *Molecular Microbiology* 64, p.953-967.
- Linkous D.A. et Oliver J.D.** (1999). Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Lett* 174, p.207-214.
- Litwin C., Rayback T. et Skinner J.** (1996). Role of catechol siderophore synthesis in *Vibrio vulnificus* virulence. *Infection and Immunity* 64, p.2834-2838.
- Liu P., Lee K., Yü K., Kou G. et Chen S.** (1996). News & notes: Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased Kuruma Prawns *Penaeus japonicus*. *Current Microbiology* 33, p.129-132.
- Liu P.C., Chen Y.C. et Lee K.K.** (2001). Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Microbios* 104, p.71-77.
- Loker E., S., Adema C., M., Zhang S.-M. et Kepler T., B.** (2004). Invertebrate immune systems - not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunological Reviews* 198, p.10-24.
- Lopez C., Carballal M.J., Azevedo C. et Villalba A.** (1997). Differential phagocytic ability of the circulating haemocyte types of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). *Diseases of Aquatic Organisms* 30, p.209-215.
- López C. et Crosa J.** (2007). Characterization of ferric-anguibactin transport in *Vibrio anguillarum*. *BioMetals* 20, p.393-403.
- Lotz J.M.** (1997). Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13, p.405-413.
- Lotz J.M., Davidson J. et Soto M.A.** (2001). Two approaches to epidemiology in shrimp aquaculture disease control. *The NewWave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001* p.219-225.
- Løvoll M., Wiik-Nielsen C.R., Tunsjø H.S., Colquhoun D., Lunder T., Sørum H. et Grove S.** (2009). Atlantic salmon bath challenged with *Moritella viscosa* - Pathogen invasion and host response. *Fish & Shellfish Immunology* 26, p.877-884.

Luna-Gonzalez A., Maeda-Martinez A.N., Vargas-Albores F., Ascencio-Valle F. et Robles-Mungaray M. (2003). Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish and Shellfish Immunology* 15, p.275-82.

Luna Acosta A., Pommier M., Thomas-Guyon H. et Haffner P. (2009). First evidence of a potential bactericidal effect due to the phenoloxidase system in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 153, p.S57-S58.

Lupp C. (2007). Host-Microbe interactions. *Nature* 449, p.803.

-M-

Macián M., Garay E., González-Candelas F., Pujalte M. et Aznar R. (2000). Ribotyping of *Vibrio* populations associated with cultured oysters (*Ostrea edulis*). *Systematic and Applied Microbiology* 23, p.409-417.

Maeda H. et Yamamoto T. (1996). Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infection. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 377, p.217-226.

Maeda T., Matsuo Y., Furushita M. et Shiba T. (2003). Seasonal dynamics in a coastal *Vibrio* community examined by a rapid clustering method based on 16S rDNA. *Fisheries Science* 69, p.385-394.

Mahon G.A.T. (1983). Selection goals in oyster breeding. *Aquaculture* 33, p.141-148.

Maiden M.C.J., Bygravesdagger J.A., FeilDagger E., Morelli G., Russelldagger J.E., Urwin R., ZhangDagger Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feaversdagger I.M., Achtman M. et Spratt B.G. (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *PNAS* 95, p.3140-3145.

Makino K., Oshima K., Kurokawa K., Yokoyama K., Uda T., Tagomori K., Iijima Y., Najima M., Nakano M., Yamashita A., Kubota Y., Kimura S., Yasunaga T., Honda T., Shinagawa H., Hattori M. et Iida T. (2003). Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* 361, p.743-9.

Manefield M., Harris L., Rice S.A., de Nys R. et Kjelleberg S. (2000). Inhibition of Luminescence and Virulence in the Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon*) Pathogen *Vibrio harveyi* by Intercellular Signal Antagonists. *Applied and Environmental Microbiology* 66, p.2079-2084.

Manefield M., Rasmussen T.B., Henzter M., Andersen J.B., Steinberg P., Kjelleberg S. et Givskov M. (2002). Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology* 148, p.1119-1127.

Mann R. (1979). Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperature. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 59, p.95-110.

Marques A., Dhont J., Sorgeloos P. et Bossier P. (2006). Immunostimulatory nature of β -glucans and baker's yeast in gnotobiotic *Artemia* challenge tests. *Fish & Shellfish Immunology* 20, p.682.

Mateo D.R., Siah A., Araya M.T., Berthe F.C.J., Johnson G.R. et Greenwood S.J. (2009). Differential *in vivo* response of soft-shell clam haemocytes against two strains of *Vibrio splendidus*: changes in cell structure, numbers and adherence. *Journal of Invertebrate Pathology* 102, p.50-56.

- Mathur J., Davis B.M. et Waldor M.K.** (2007). Antimicrobial peptides activate the *Vibrio cholerae* sigmaE regulon through an OmpU-dependent signalling pathway. *Mol Microbiol* 63, p.848-858.
- Matrisian L.M.** (1990). Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 6, p.121-125.
- Maurer D. et Comps M.** (1986). Mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon: facteurs du milieu, aspects biogéochimiques et histologiques. *Pathology in Marine Aquaculture, European Aquaculture Society* p.29-41.
- May M.J. et Ghosh S.** (1998). Signal transduction through NF- κ B. *Immunology today* 19, p.80-88.
- McCarter L.L.** (2001). Polar flagellar motility of the Vibrionaceae. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65, p.445-462.
- McCarty S.C. et Atlas R.M.** (1993). Effect of amplicon size on PCR detection of bacteria exposed to chlorine. *PCR Methods and Applications* 3, p.181-185.
- McFall-Ngai M.J.** (2000). Negotiations between animals and bacteria: the 'diplomacy' of the squid-vibrio symbiosis. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 126, p.471-480.
- McKillip J.L., Jaykus L.A. et Drake M.** (1999). Nucleic acid persistence in heat-killed *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated skim milk. *Journal of Food Production* 62, p.839-844.
- Medzhitov R.** (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, p.819-826.
- Mekalanos J.J.** (1992). Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *Journal of Bacteriology* 174, p.1-7.
- Menasveta P.** (2002). Improved Shrimp Growout Systems for Disease Prevention and Environmental Sustainability in Asia. *Reviews in Fisheries Science* 10, p.391 - 402.
- Ménez A., Goyffon M. et Gillet D.** (2006). Les toxines: pour le pire et désormais le meilleur. *Biofutur* 272, p.22-42.
- Miliotis M., Tall B. et Gray R.** (1995). Adherence to and invasion of tissue culture cells by *Vibrio hollisae*. *Infection and Immunity* 63, p.4959-4963.
- Miller M.B. et Bassler B.L.** (2001). Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55, p.165-199.
- Millikan D.S. et Ruby E.G.** (2002). Alterations in *Vibrio fischeri* Motility Correlate with a Delay in Symbiosis Initiation and Are Associated with Additional Symbiotic Colonization Defects. *Applied and Environmental Microbiology* 68, p.2519-2528.
- Milton D.L.** (2006). Quorum sensing in vibrios: Complexity for diversification. *International Journal of Medical Microbiology* 296, p.61-71.
- Milton D.L., O'Toole R., Horstedt P. et Wolf-Watz H.** (1996). Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology* 178, p.1310-1319.
- Miossec L., Allain G., Arzul I., François C., Garcia C. et Cameron A.R.** (2009a). First results of an epidemiological study on oyster (*Crassostrea gigas*) mortality events in France during summer 2008. *Proceedings of the 12th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics*, Durban, South Africa, 10-14 August 2009: 12, 231p.

- Miossec L., Le Deuff R. et Gouletquer P.** (2009b). Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). *ICES Cooperative Research Report* 299, p.42.
- Mitta G., Vandenbulcke F., Hubert F. et Roch P.** (1999). Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *Journal of Cell Science* 112, p.4233-4242.
- Mitta G., Vandenbulcke F., Hubert F., Salzet M. et Roch P.** (2000a). Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *The Journal of Biological Chemistry* 275, p.12954-62.
- Mitta G., Vandenbulcke F. et Roch P.** (2000b). Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Letters* 486, p.185-190.
- Miyoshi S.I., Nakazawa H., Kawata K., Tomochika K.C., Tobe K. et Shinoda S.** (1998). Characterization of the hemorrhagic reaction caused by *Vibrio vulnificus* metalloprotease, a member of the thermolysin family. *Infection and Immunity* 66, p.4851-4855.
- Miyoshi S.I. et Shinoda S.** (2000). Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes and Infection* 2, p.91-98.
- Mok K., Wingreen N. et Bassler B.** (2003). *Vibrio harveyi* quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression. *The European Molecular Biology Organization Journal* 22, p.870-881.
- Moncada S., Palmer R.M. et Higgs E.A.** (1991). Nitrite oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacologie Revue* 43, p.109-142.
- Montagnani C.** (2002). Immunité chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*: Caractérisation d'un inhibiteur de métalloprotéase & de facteurs de la voie de signalisation Rel/NF- κ B. *PhD Thesis*, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), Paris, 269p.
- Montagnani C., Avarre J.C., de Lorgeril J., Quiquand M., Boulo V. et Escoubas J.M.** (2007a). First evidence of the activation of Cg-timp, an immune response component of Pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway. *Dev Comp Immunol* 31, p.1-11.
- Montagnani C., Avarre J.C., de Lorgeril J., Quiquand M., Boulo V. et Escoubas J.M.** (2007b). First evidence of the activation of Cg-timp, an immune response component of Pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway. *Developmental and Comparative Immunology* 31, p.1-11.
- Montagnani C., Kappler C., Reichhart J.M. et Escoubas J.M.** (2004). Cg-Rel, the first Rel/NF- κ B homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Letters* 561, p.75-82.
- Montagnani C., Labreuche Y. et Escoubas J.M.** (2008). Cg-I κ B, a new member of the I κ B protein family characterized in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology* 32, p.182-190.
- Montagnani C., Le Roux F., Berthe F. et 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 Letters* 500, p.64-70.
- Montagnani C., Tirape A., Boulo V. et Escoubas J.-M.** (2005). The two Cg-timp mRNAs expressed in oyster hemocytes are generated by two gene families and differentially expressed during ontogenesis. *Developmental and Comparative Immunology* 29, p.831-839.
- Montes J.F., Durfort M. et Garcia-Valero J.** (1995). Cellular defence mechanism of the clam *Tapes semidecussatus* against infection by the protozoan *Perkinsus* sp. *Cell and tissue research* 279, p.529-538.
- Moriarty D.J.W.** (1998). Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164, p.351-358.

- Moss S.M.** (2004). Biosecure, zero-exchange shrimp production technology (Biozest): project overview. *World Aquaculture*: 415p.
- Mota L.J., Sorg I. et Cornelis G.R.** (2005). Type III secretion: The bacteria-eukaryotic cell express. *FEMS Microbiology Letters* 252, p.1-10.
- Moxon E.R. et Kroll J.S.** (1990). The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 150, p.65-85.
- Munro J., Oakey J., Bromage E. et Owens L.** (2003). Experimental bacteriophage-mediated virulence in strains of *Vibrio harveyi*. *Diseases of Aquatic Organisms* 54, p.187-194.
- Murphree R.L. et Tamplin M.L.** (1995). Uptake and retention of *Vibrio cholerae* O1 in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, p.3656-3660.
- Murray A.G.** (2008). Existing and potential use of models in the control and prevention of disease emergencies affecting aquatic animals. *Revue scientifique et technique - Office international des épizooties* 27, p.211-228.
- Murray A.G. et Peeler E.J.** (2005). A framework for understanding the potential for emerging diseases in aquaculture. *Preventive Veterinary Medicine* 67, p.223-235.

-N-

- Naciri-Graven Y., Launey S., Lebayon N., Gerard A. et Baud J.-P.** (2000). Influence of parentage upon growth in *Ostrea edulis*: evidence for inbreeding depression. *Genetics Research* 76, p.159-168.
- Nagase H. et Woessner J.F.** (1999). Matrix metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry* 274, p.21491-4.
- Nakai T. et Park S.C.** (2002). Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Research in Microbiology* 153, p.13-18.
- Nakamura Y., Itoh T., Matsuda H. et Gojobori T.** (2004). Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes. *Nature Genetics* 36, p.760-766.
- Nakayama K. et Maruyama T.** (1998). Differential production of active oxygen species in photo-symbiotic and non-symbiotic bivalves. *Developmental and Comparative Immunology* 22, p.151-159.
- Nell J.A.** (2002). Farming triploid oysters. *Aquaculture* 210, p.69-88.
- Nell J.A. et Perkins B.** (2005). Studies on triploid oysters in Australia: farming potential of all-triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Port Stephens, New South Wales, Australia. *Aquaculture Research* 36, p.530-536.
- Nell J.A., Smith I.R. et McPhee C.C.** (2000). The Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould 1850) breeding programme: progress and goals. *Aquaculture Research* 31, p.45-49.
- Nesper J., Lauriano C.M., Klose K.E., Kapfhammer D., Kraiss A. et Reidl J.** (2001). Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El tor galU and galE mutants: influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. *Infection and Immunity* 69, p.435-445.
- Nhung P.H., Shah M.M., Ohkusu K., Noda M., Hata H., Sun X.S., Iihara H., Goto K., Masaki T., Miyasaka J. et Ezaki T.** (2007). The *dnaJ* gene as a novel phylogenetic marker for identification of *Vibrio* species. *Systematic and Applied Microbiology* 30, p.309-315.

- Nicolas J.L., Basuyaux O., Mazurié J. et Thébault A.** (2002). *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Diseases of Aquatic Organisms* 50, p.35-43.
- Nicolas J.L., Corre S., Gauthier G., Robert R. et Ansquer D.** (1996). Bacterial problems associated with scallop (*Pecten maximus*) larval culture. *Diseases of Aquatic Organisms* 27, p.67-76.
- Nikaido H.** (2009). Multidrug Resistance in Bacteria. *Annual Review of Biochemistry* 78, p.119-146.
- Nikoskelainen S., Ouwehand A., Salminen S. et Bylund G.** (2001). Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture* 198, p.229-236.
- NIMPIS** (2002). Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Ed. Hewitt C.L. M.R.B., Sliwa C., McEnulty, F.R., Murphy, N.E., Jones T. and Cooper, S., National Introduced Marine Pest Information System.
- Nocker A., Lepo J.E. et Snyder R.A.** (2004). Influence of an oyster reef on development of the microbial heterotrophic community of an estuarine biofilm. *Applied and Environmental Microbiology* 70, p.6834-6845.
- Nogales B., Aguiló-Ferretjans M.M., Martín-Cardona C., Lalucat J. et Bosch R.** (2007). Bacterial diversity, composition and dynamics in and around recreational coastal areas. *Environmental Microbiology* 9, p.1913-1929.
- Normand J.** (2009). Déterminismes génétiques de l'allocation à la reproduction chez les huîtres creuses (*Crassostrea gigas*) triploïdes. Université de La Rochelle, France, 224p.
- Normand J., Ernande B., Haure J., McCombie H. et Boudry P.** (2009). Reproductive effort and growth in *Crassostrea gigas*: comparison of young diploid and triploid oysters issued from natural crosses or chemical induction. *Aquatic Biology* 7, p.229-241.
- Normand J., Le Pennec M. et Boudry P.** (2008). Comparative histological study of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) reared in an estuarine farming site in France during the 2003 heatwave. *Aquaculture* 282, p.124-129.
- Nottage A.S. et Birkbeck T.H.** (1990). Interactions between different strains of *Vibrio alginolyticus* and hemolymph fractions from adult *Mytilus edulis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 56, p.15-19.
- Nyholm V.S., Stewart J.J., Ruby G.E. et McFall-Ngai J.M.** (2009). Recognition between symbiotic *Vibrio fischeri* and the haemocytes of *Euprymna scolopes*. *Environmental Microbiology* 11, p.483-493.

-O-

- O'Flynn F.M., McGeachy S.A., Friars G.W., Benfey T.J. et Bailey J.K.** (1997). Comparisons of cultured triploid and diploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *ICES Journal of Marine Science* 54, p.1160-1165.
- O'Toole R., Lundberg S., Fredriksson S.-A., Jansson A., Nilsson B. et Wolf-Watz H.** (1999). The Chemotactic Response of *Vibrio anguillarum* to Fish Intestinal Mucus Is Mediated by a Combination of Multiple Mucus Components. *Journal of Bacteriology* 181, p.4308-4317.
- O'Toole R., Milton D.L. et Wolf-Watz H.** (1996). Chemotactic motility is required for invasion of the host by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Molecular Microbiology* 19, p.625-637.
- Oh M.-J., Kim W.-S., Kitamura S.-I., Lee H.-k., Son B.W., Jung T.-S. et Jung S.-J.** (2006). Change of pathogenicity in Olive flounder *Paralichthys olivaceus* by co-infection of *Vibrio harveyi*, *Edwardsiella tarda* and marine birnavirus. *Aquaculture* 257, p.156-160.

- Okujo N., Saito M., Yamamoto S., Yoshida T., Miyoshi S. et Shinoda S.** (1994). Structure of vulnibactin, a new polyamine-containing siderophore from *Vibrio vulnificus*. *BioMetals* 7, p.109-116.
- Olafsen J.A., Fletcher T.C. et Grant P.T.** (1992). Agglutinin activity in pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following in vivo *Vibrio anguillarum* challenge. *Developmental & Comparative Immunology* 16, p.123-138.
- Olafsen J.A., Mikkelsen H.V., Giæver H.M. et Høvik Hansen G.** (1993). Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 59, p.1848-1854.
- Ortigosa M., Garay E. et Pujalte M.J.** (1994). Numerical taxonomy of *Vibrionaceae* isolated from oysters and seawater along an annual cycle. *Systematic and Applied Microbiology* 17, p.216-225.
- Osek J., Svennerholm A.M. et Holmgren J.** (1992). Protection against *Vibrio cholerae* El Tor infection by specific antibodies against mannose-binding hemagglutinin pili. *Infection and Immunity* 60, p.4961-4964.
- Ouwehand A.C., Salminen S. et Isolauri E.** (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, p.279-289.
- Owens L. et Busico-Salcedo N.** (2006). *Vibrio harveyi*: Pretty problems in paradise. Ed. Thompson F.L., Austin B. et Swings J., *In The biology of Vibrios. Washington, DC.* 266-280p.

-P-

- Paillard C.** (2004). Rôle de l'environnement dans les interactions hôte-pathogène: développement d'un modèle de vibriose chez les bivalves. Synthèse des travaux de recherche (1987-2004). *Rapport d'Habilitation à Diriger des Recherches*. Université de Bretagne Occidentale, Brest.
- Paillard C., Gausson S., Nicolas J.L., le Pennec J.P. et Haras D.** (2006). Molecular identification of *Vibrio tapetis*, the causative agent of the brown ring disease of *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture* 253, p.25-38.
- Paillard C., Roux F.L. et Borrego J.J.** (2004). Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquatic Living Resources* 17, p.477-498.
- Pakingking J.R., Takano R., Nishizawa T., Mori K., Lida Y., Arimoto M. et Muroga K.** (2003). Experimental coinfection with aquabirnavirus and viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), *Edwardsiella tarda* or *Streptococcus iniae* in Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathology* 38, p.15-21.
- Pallen M.J. et Wren B.W.** (2007). Bacterial pathogenomics. *Nature* 449, p.835-842.
- Pamer E.G.** (2007). Immune responses to commensal and environmental microbes. *Nature Immunology* 8, p.1173-1178.
- Panigrahi A., Kiron V., Kobayashi T., Puangkaew J., Satoh S. et Sugita H.** (2004). Immune response in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102, p.279-388.
- Paranjpye R.N., Lara J.C., Pepe J.C., Pepe C.M. et Strom M.S.** (1998). The Type IV Leader Peptidase/N-Methyltransferase of *Vibrio vulnificus* Controls Factors Required for Adherence to HEp-2 Cells and Virulence in Iron-Overloaded Mice. *Infection and Immunity* 66, p.5659-5668.
- Paranjpye R.N. et Strom M.S.** (2005). A *Vibrio vulnificus* Type IV Pilin Contributes to Biofilm Formation, Adherence to Epithelial Cells, and Virulence. *Infection and Immunity* 73, p.1411-1422.

- Park K.-S., Ono T., Rokuda M., Jang M.-H., Okada K., Iida T. et Honda T.** (2004). Functional Characterization of Two Type III Secretion Systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity* 72, p.6659-6665.
- Parker R.B.** (1974). Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition Health* 29, p.4-8.
- Parkinson J.S., Ames P. et Studdert C.A.** (2005). Collaborative signaling by bacterial chemoreceptors. *Current Opinion in Microbiology* 8, p.116-121.
- Parsek M.R.** (2007). Microbiology: Bilingual bacteria. *Nature* 450, p.805-807.
- Pépin J.F., Riou A. et Renault T.** (2008). Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *Journal of Virological Methods* 149, p.269-276.
- Perdue J.A., Beattie J.H. et Kenneth K.C.** (1981). Some relationships between gametogenetic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington State. *Journal of Shellfish Research* 1, p.9-16.
- Perkins F.O., Haven D.S., Morales-Alamo R. et Rhodes M.W.** (1980). Uptake and elimination of bacteria in shellfish. *Journal of Food Protection* 43, p.124-126.
- Perkins N.D.** (2000). The Rel/NF- κ B family: friend and foe. *Trends in Biochemical Sciences* 25, p.434-440.
- Phuoc L.H., Corteel M., Nauwynck H.J., Pensaert M.B., Alday-Sanz V., Broeck W.V.d., Sorgeloos P. et Bossier P.** (2008). Increased susceptibility of white spot syndrome virus-infected *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio campbellii*. *Environmental Microbiology* 10, p.2718-2727.
- Phuoc L.H., Corteel M., Thanh N.C., Nauwynck H., Pensaert M., Alday-Sanz V., den Broeck W.V., Sorgeloos P. et Bossier P.** (2009). Effect of dose and challenge routes of *Vibrio spp.* on co-infection with white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 290, p.61-68.
- Picchiatti S., Mazzini M., Taddei A.R., Renna R., Fausto A.M., Mulero V., Carnevali O., Cresci A. et Abelli L.** (2008). Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: Immunohistochemical and ultrastructural studies. *Fish & Shellfish Immunology* 22, p.57-67.
- Piferrer F., Beaumont A., Falguière J.-C., Flajshans M., Haffray P. et Colombo L.** (2009). Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293, p.125-156.
- Pipe R.K.** (1990). Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem J* 22, p.595-603.
- Pouvreau S. et Lepennec M.** (2006). Ecophysiology of the reproduction of cupped oyster, *Crassostrea gigas*. *IFREMER* <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1867/>,
- Prieur D.** (1981a). Les relations entre mollusques bivalves et bactéries hétérotrophes en milieu marin. Etude analytique et expérimentale. *thèse de doctorat d'Etat en Sciences Naturelles, Brest.* p.226.
- Prieur D.** (1981b). Nouvelles données sur les relations entre bactéries et bivalves marins. *Hyalotis* 11, p.251-9.
- Prieur D., Mével G., Nicolas J.L., Plusquellec A. et Vigneulle M.** (1990). Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanography and Marine Biology Annual Reviews* 28, p.277-352.
- Pruzzo C., Gallo G. et Canesi L.** (2005). Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environmental Microbiology* 7, p.761-72.

Pujalte M.J., Ortigosa M., Macián M.C. et Garay E. (1999). Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater. *International microbiology* 2, p.259-266.

Pukatzi S., Ma A.T., Sturtevant D., Krastins B., Sarracino D., Nelson W.C., Heidelberg J.F. et Mekalanos J.J. (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, p.1528-1533.

-QR-

Quentel C., Bremont M. et Pouliquen H. (2007). La vaccination chez les poissons d'élevage. *INRA Productions Animales* 20, p.233-238.

Quilang J., Wang S., Li P., Abernathy J., Peatman E., Wang Y., Wang L., Shi Y., Wallace R., Guo X. et Liu Z. (2007). Generation and analysis of ESTs from the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin and identification of microsatellite and SNP markers. *BMC Genomics* 8, p.157.

Quillet E., Boudry P. et Lapègue S. (2007). Variabilité génétique de la réponse aux organismes pathogènes: un outil pour améliorer la santé des mollusques et poissons d'élevage. *INRA Productions Animales* 20, p.239-252.

Quillet E., Chevassus B., Blanc J., Krieg F. et Chourrou D. (1988). Performances of auto and allotriploids in salmonids. I. Survival and growth in fresh water farming. *Aquatic Living Resources* 1, p.29-43.

Ran Kim Y. et Haeng Rhee J. (2003). Flagellar basal body *flg* operon as a virulence determinant of *Vibrio vulnificus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304, p.405.

Rasch M., Buch C., Austin B., Slierendrecht W.J., Ekmann K.S., Larsen J.L., Johansen C., Riedel K., Eberl L., Givskov M. et Gram L. (2004). An Inhibitor of Bacterial Quorum Sensing Reduces Mortalities Caused by Vibriosis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Systematic and Applied Microbiology* 27, p.350-359.

Reen F.J., Almagro-Moreno S., Ussery D. et Boyd E.F. (2006). The genomic code: inferring *Vibrionaceae* niche specialization. *Nat Rev Micro* 4, p.697.

Reidl J. et Klose K.E. (2002). *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. *FEMS Microbiology Reviews* 26, p.125.

Ren D., Sims J., J. et Wood T., K. (2001). Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Environmental Microbiology* 3, p.731-736.

Renault T., Le Deuff R., Cochennec N., Chollet B. et Maffart P. (1995). 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. *Veterinary Research* 26, p.539-543.

Reynaud Y. (2008). Identification de marqueurs génétiques de la virulence chez *Vibrio nigripulchritudo*, un pathogène de crevettes pénéides en Nouvelle-Calédonie. *Thèse de Doctorat*, Université Paris 6 – Pierre et Marie Curie, Paris, 230p.

Reynaud Y., Saulnier D., Mazel D., Goarant C. et Le Roux F. (2008). Correlation between detection of a plasmid and high-level virulence of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Applied and Environmental Microbiology* 74, p.3038-3047.

- Richards G.P.** (1988). Microbial purification of shellfish: a review of depuration and relaying. *Journal of Food Protection* 51, p.218-251.
- Roch P.** (1999). Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172, p.125-145.
- Rodríguez J., Espinosa Y., Echeverría F., Cárdenas G., Román R. et Stern S.** (2007). Exposure to probiotics and β -1,3/1,6-glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to White Spot Syndrome Virus challenge and pond culture. *Aquaculture* 273, p.405-415.
- Rohwer F., Seguritan V., Azam F. et Knowlton N.** (2002). Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series* 243, p.1-10.
- Rolff J. et Siva-Jothy M.T.** (2003). Invertebrate Ecological Immunology. *Science* 301, p.472-475.
- Rosa R.D., De Lorgeril J., Fievet J., Bulet P., Destoumieux-Garzòn D. et Bachère E.** (2009). Caractérisation des Big-défensines, une nouvelle famille de peptides antimicrobiens chez l'huître *Crassostrea gigas*. *Immunité des invertébrés*, Poitiers: 14p.
- Rosenberg E. et Ben-Haim Y.** (2002). Microbial diseases of corals and global warming. *Environmental Microbiology* 4, p.318-326.
- Rosenberg E. et Koren O.** (2006). Vibrios in coral health and disease. Ed. Thompson F.L., Austin B. et Swings J., *In Biology of Vibrios. ASM press, Washington D.C.* 231-238p.
- Rossetto O., Morbiato L., Caccin P., Rigoni M. et Montecucco C.** (2006). Presynaptic enzymatic neurotoxins. *Journal of Neurochemistry* 97, p.1534-1545.
- Royer J., Segueineau C., Park K.-I., Pouvreau S., Choi K.-S. et Costil K.** (2008). Gametogenetic cycle and reproductive effort assessed by two methods in 3 age classes of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in Normandy. *Aquaculture* 277, p.313-320.
- Ruby E.G.** (1996). Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organ symbiosis. *Annual Review of Microbiology* 50, p.591-624.

-S-

- Sakai M.** (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172, p.63-92.
- Samain J.F., Dégremont L., Soletchnik P., Haure J., Bedier 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. et 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, p.227-243.
- Samain J.F. et McCombie H.** (2008). Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *The Moresst Project* p.379p.
- Sansonetti P.J. et Medzhitov R.** (2009). Learning Tolerance while Fighting Ignorance. *Cell* 138, p.416-420.
- Saulnier D., De Decker S. et 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. *Journal of Microbiological Methods* 77, p.191-197.

- Saulnier D., De Decker S., Haffner P., Cobret L., Robert M. et Garcia C.** (2010). A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. *Microbial Ecology* 59, p.787-798.
- Saulnier D., Reynaud Y., Arzul I., Miossec L., Leroux F. et Goarant C.** (2007). Emergence de maladies chez les organismes d'intérêt aquacole: quelques scénarios illustrés d'exemples. *INRA Productions Animales* 20, p.207-212.
- Sauvage C., Boudry P., de Koning D.J., Haley C.S., Heurtebise S. et Lapègue S.** (2010). QTL for resistance to summer mortality and OsHV-1 load in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Animal Genetics* 9999,
- Sbordoni V., de Matthaëis E., Sbordoni M.C., La Rosa G. et Mattoccia M.** (1986). Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Aquaculture* 57, p.239-251.
- Schauder S. et Bassler B.L.** (2001). The languages of bacteria. *Genes & Development* 15, p.1468-1480.
- Schmitt P., Gueguen Y., Desmarais E., Bachere E. et de Lorgeril J.** (2010). Molecular diversity of antimicrobial effectors in the oyster *Crassostrea gigas*. *BMC Evolutionary Biology* 10, p.23.
- Schott E.J., Fernandez-Robledo J.A., Alavi M.R. et Vasta G.R.** (2008). Susceptibility of *Crassostrea ariakensis* (Fujita 1913) to *Bonamia* and *Perkinsus* spp. infections: Potential for disease transmission between Oyster species. *Journal of Shellfish Research* 27, p.541-549.
- Schulenburg H., Leopold Kurz C. et Ewbank J.J.** (2004). Evolution of the innate immune system: the worm perspective. *Immunological Reviews* 198, p.36-58.
- Sekiya K., Ohishi M., Ogino T., Tamano K., Sasakawa C. et Abe A.** (2001). Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, p.11638-11643.
- Selvin J. et Lipton A.P.** (2003). *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 57, p.147-150.
- Seo J.-K., Crawford J.M., Stone K.L. et Noga E.J.** (2005). Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338, p.1998-2004.
- Shao C.-P. et Hor L.-I.** (2001). Regulation of metalloprotease gene expression in *Vibrio vulnificus* by a *Vibrio harveyi* LuxR homologue. *Journal of Bacteriology* 183, p.1369-1375.
- Sheridan G.E., Masters C.I., Shallcross J.A. et Mackey B.M.** (1998). Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Applied and Environmental Microbiology* 64, p.1313-1318.
- Sheridan G.E.C., Szabo E.A. et Mackey B.M.** (1999). Effect of post-treatment holding conditions on detection of tufA mRNA in ethanol-treated *Escherichia coli*: implications for RT-PCR-based indirect viability tests. *Letters in Applied Microbiology* 29, p.375-379.
- Shinoda S.** (1999). Protein toxins produced by pathogenic vibrios. *Journal of Natural Toxins* 8, p.259-269.
- Shivu M., Rajeeva BC, Girisha SK, Karunasagar I, Krohne G et I. K.** (2006). Molecular characterization of *Vibrio harveyi* bacteriophages isolated from aquaculture environments along the coast of India. *Environmental Microbiology* 9, p.322-331.

- Shpigel M., Barber B.J. et Mann R.** (1992). Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology, and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 161, p.15-25.
- Silva C.P., Waterfield N.R., Daborn P.J., Dean P., Chilver T., Au C., Sharma S., Potter U., Reynolds S. et French-Constant R.** (2002). Bacterial infection of a model insect: *Photobacterium luminescens* and *Manduca sexta*. *Cellular Microbiology* 4, p.329-339.
- Simpkins S.A., Chan A.B., Hays J., Popping B. et Cook N.** (2000). An RNA transcription-based amplification technique (NASBA) for the detection of viable *Salmonella enterica*. *Letters in Applied Microbiology* 30, p.75-79.
- Singh J., Behal A., Singla N., Joshi A., Birbian N., Singh S., Bali V. et Batra N.** (2009). Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances. *Biotechnology Journal* 4, p.480-494.
- Sminia T. et Van Der Knaap W.P.W.** (1987). Cells and molecules in molluscan immunology. *Developmental and Comparative Immunology* 11, p.17-28.
- Smith V.J., Brown J.H. et Hauton C.** (2003). Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? *Fish & Shellfish Immunology* 15, p.71-90.
- Snieszko S.F.** (1973). The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *Journal of Fish Biology* 6, p.197-208.
- Soderhall K. et Smith V.J.** (1983). Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Dev Comp Immunol* 7, p.229-39.
- Soletchnik P., Lambert C. et Costil K.** (2005). Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to environmental rearing conditions. *Journal of Shellfish Research* 4, p.197-207.
- Soletchnik P., Le Moine O., Faury N., Razet D., Geairon P. et Gouletquer P.** (1999). Summer mortality of the oyster in the Bay Marennes-Oléron: Spatial variability of environment and biology using a geographical information system (GIS). *Aquatic Living Resources* 12, p.131-143.
- Soletchnik P., Razet D., Geairon P., Faury N. et Gouletquer P.** (1997). Ecophysiologie de la maturation sexuelle et de la ponte de l'huître creuse *Crassostrea gigas*: réponses métaboliques (respiration) et alimentaires (filtration, absorption) en fonction des différents stades de maturation. *Aquatic Living Resources* 10, p.177-185.
- Soletchnik P., Ropert M., Mazurie J., Fleury P.G. et Le Coz F.** (2007). Relationships between oyster mortality patterns and environmental data from monitoring databases along the coasts of France. *Aquaculture* 271, p.384-400.
- Son N.T. et Fleet G.H.** (1980). Behavior of pathogenic bacteria in the oyster, *Crassostrea commercialis*, during depuration, re-laying, and storage. *Appl. Environ. Microbiol.* 40, p.994-1002.
- Song Y., Cheng W. et Wang C.** (1993). Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infectious for cultured shrimp in Taiwan. *Journal of Invertebrate Pathology* 61, p.24-31.
- Soto-Rodriguez S., Roque A., Lizarraga-Partida M., Guerra-Flores A. et Gomez-Gill B.** (2003). Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana* nauplii. *Diseases of Aquatic Organisms* 53, p.231-240.
- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A., Kämpfer P., Maiden M.C., Nesme X., Rossello-Mora R., Swings J., Truper H.G., Vauterin L., Ward A.C. et Whitman W.B.** (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, p.1043-1047.
- Stearns S.C.** (1976). Life-history tactics: A review of the ideas. *The Quarterly Review of Biology* 51, p.3-47.

Stork M., Di Lorenzo M., Mourino S., Osorio C.R., Lemos M.L. et Crosa J.H. (2004). Two tonB systems function in iron transport in *Vibrio anguillarum*, but only one is essential for virulence. *Infection and Immunity* 72, p.7326-7329.

Stork M., Di Lorenzo M., Welch T.J., Crosa L.M. et Crosa J.H. (2002). Plasmid-mediated iron uptake and virulence in *Vibrio anguillarum*. *Plasmid* 48, p.222-228.

Subasinghe R., Bondad-Reantaso M. et McGladdery S. (2001). Aquaculture development, health and wealth. *Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium*, Bangkok, Thailand: 167-191p.

Sugumar G., Nakai T., Hirata Y., Matsubara D. et Muroga K. (1998). *Vibrio splendidus* biovar I1 as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 33, p.111-118.

Sun B., Zhang X.H., Tang X., Wang S., Zhong Y., Chen J. et Austin B. (2007). A single residue change in *Vibrio harveyi* hemolysin results in the loss of phospholipase and hemolytic activities and pathogenicity for turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of Bacteriology* 189, p.2575-2579.

Sunden S.L.F. et Davis S.K. (1991). Evaluation of genetic variation in a domestic population of *P. vannamei* (Boone): a comparison with three natural populations. *Aquaculture* 97, p.131-142.

-T-

Tacket C., Losonsky G., Nataro J., Cryz S., Edelman R., Fasano A., Michalski J. et Levine J.K.M. (1993). Safety and immunogenicity of live oral cholera vaccine candidate CVD 110, a delta ctxA delta zot delta ace derivative of El Tor Ogawa *Vibrio cholerae*. *Journal of Infectious Diseases* 168, p.1536-1540.

Tacket C.O., Taylor R.K., Losonsky G., Lim Y., Nataro J.P., Kaper J.B. et Levine M.M. (1998). Investigation of the roles of Toxin-Coregulated Pili and Mannose-Sensitive Hemagglutinin Pili in the pathogenesis of *Vibrio cholerae* O139 infection. *Infection and Immunity* 66, p.692-695.

Takahashi K.G., Nakamura A. et Mori K. (2000). Inhibitory effects of ovoglobulins on bacillary necrosis in larvae of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology* 75, p.212-7.

Takeda Y. (1988). Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Methods in Enzymology* 165, p.189-193.

Tall B.D., Fall S., Pereira M.R., Ramos-Valle M., Curtis S.K., Kothary M.H., Chu D.M.T., Monday S.R., Kornegay L., Donkar T., Prince D., Thunberg R.L., Shangraw K.A., Hanes D.E., Khambaty F.M., Lampel K.A., Bier J.W. et Bayer R.C. (2003). Characterization of *Vibrio fluvialis*-like strains implicated in Limp Lobster Disease. *Applied and Environmental Microbiology* 69, p.7435-7446.

Tamano K., Aizawa S., Katayama E., Nonaka T., Imajoh-Ohmi S., Kuwae A., Nagai S. et Sasakawa C. (2000). Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *Embo J* 19, p.3876-3887.

Taris N., Ernande B., McCombie H. et Boudry P. (2006a). Phenotypic and genetic consequences of size selection at the larval stage in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 333, p.147-158.

Taris N., Sauvage C., Batista F.M., Baron S., Ernande B., Haffray P. et Boudry P. (2006b). Conséquences génétiques de la production de larves d'huîtres en éclosion: étude des processus de dérive et de sélection. *Les Actes du BRG* 6, p.521-541.

- Taylor D., Killeen K., Hack D., Kenner J., Coster T., Beattie D., Ezzell J., Hyman T., Trofa A. et Sjogren M.** (1994). Development of a live, oral, attenuated vaccine against El Tor cholera. *Journal of Infectious Diseases* 170, p.1518-1523.
- Teo J.W.P., Zhang L.H. et Poh C.L.** (2003). Cloning and characterization of a metalloprotease from *Vibrio harveyi* strain AP6. *Gene* 303, p.147-156.
- Thanardkit P., Khunrae P., Suphantharika M. et Verduyn C.** (2002). Glucan from spent brewer's yeast: preparation, analysis and use as a potential immunostimulant in shrimp feed. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18, p.527-539.
- Thompson F.L., Austin B. et Swings J.** (2006). The biology of Vibrios. Ed. Thompson F.L., Austin B. et Swings J., ASM Press. *American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.* 423p.
- Thompson F.L., Gomez-Gil B., Vasconcelos A.T.R. et Sawabe T.** (2007). Multilocus Sequence Analysis Reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* Are Distinct Species. *Applied and Environmental Microbiology* 73, p.4279-4285.
- Thompson F.L., Lida T. et Swings J.** (2004a). Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, p.403-31.
- Thompson J.R., Pacocha S., Pharino C., Klepac-Ceraj V., Hunt D.E., Benoit J., Sarma-Rupavtarm R., Distel D.L. et Polz M.F.** (2005). Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population. *Science* 307, p.1311-1313.
- Thompson J.R., Randa M.A., Marcelino L.A., Tomita-Mitchell A., Lim E. et Polz M.F.** (2004b). Diversity and dynamics of a north atlantic coastal *Vibrio* community. *Applied and Environmental Microbiology* 70, p.4103-10.
- Tinh N.T.N., Linh N.D., Wood T.K., Dierckens K., Sorgeloos P. et Bossier P.** (2007). Interference with the quorum sensing systems in a *Vibrio harveyi* strain alters the growth rate of gnotobiotically cultured rotifer *Brachionus plicatilis*. *Journal of Applied Microbiology* 103, p.194-203.
- Tirape A., Bacque C., Brizard R., Vandenbulcke F. et Boulo V.** (2007). Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Developmental and Comparative Immunology* 31, p.859-873.
- Todd C. et Havenhand J.** (1983). Reproductive effort: its definition, measurement, and interpretation in relation to molluscan life-history strategies. *Journal of Molluscan Studies* 12A, p.203-208.
- Tran D., Massabuau J.-C. et Vercelli C.** (2008). Influence of sex and spawning status on oxygen consumption and blood oxygenation status in oysters *Crassostrea gigas* cultured in a Mediterranean lagoon (Thau, France). *Aquaculture* 277, p.58-65.
- Travers M.-A., Basuyaux O., Le Goic N., Huchette S., Nicolas J.-L., Koken M. et Paillard C.** (2008). Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Global Change Biology* 15, p.1365-1376.
- Travis J., Potempa J. et Maeda H.** (1995). Are bacterial proteinases pathogenic factors? *Trends in Microbiology* 3, p.405-407.
- Trust T.J., Klotz F.W. et Miller L.H.** (1986). Pathogenesis of infectious diseases of fish. *Annual Review of Microbiology* 40, p.479-502.
- Tubiash H.S., Chanley P.E. et Leifson E.** (1965). Bacillary Necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *Journal of Bacteriology* 90, p.1036-1044.

Turner J.W., Good B., Cole D. et Lipp E.K. (2009). Plankton composition and environmental factors contribute to *Vibrio* seasonality. *ISME J* 3, p.1082-1092.

Tzou P., De Gregorio E. et Lemaitre B. (2002). How Drosophila combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology* 5, p.102-110.

-UVW-

Uroz S., D'Angelo-Picard C., Carlier A., Elasri M., Sicot C., Petit A., Oger P., Faure D. et Dessaux Y. (2003). Novel bacteria degrading N-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plant-pathogenic bacteria. *Microbiology* 149, p.1981-1989.

Vadstein O. (1997). The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture* 155, p.401-417.

Van der Meer J. (2006). An introduction to Dynamic Energy Budget (DEB) models with special emphasis on parameter estimation. *Journal of Sea Research* 56, p.85-102.

Vance R.E., Isberg R.R. et Portnoy D.A. (2009). Patterns of Pathogenesis: Discrimination of Pathogenic and Nonpathogenic Microbes by the Innate Immune System. *Cell Host & Microbe* 6, p.10-21.

Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K. et Swings J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 60, p.407-438.

Vasconcelos G.J. et Lee J.S. (1972). Microbial flora of Pacific Oysters (*Crassostrea gigas*) subjected to ultraviolet-irradiated seawater. *Applied Microbiology* 23, p.11-16.

Verschuere L., Heang H., Criel G., Sorgeloos P. et Verstraete W. (2000a). Selected bacterial strains protect *Artemia* spp. from the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. *Applied and Environmental Microbiology* 66, p.1139-1146.

Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P. et Verstraete W. (2000b). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, p.655-671.

Vezzulli L., Pezzati E., Moreno M., Fabiano M., Pane L., Pruzzo C. et The VibrioSea C. (2009). Benthic ecology of *Vibrio* spp. and pathogenic *Vibrio* species in a coastal Mediterranean environment (La Spezia Gulf, Italy). *Microbial Ecology* 58, p.808.

Vezzulli L., Previati M., Pruzzo C., Marchese A., Bourne D., G. et Cerrano C. (in press). *Vibrio* infections triggering mass mortality events in a warming Mediterranean Sea. *Environmental Microbiology*.

Vidal O., Granja C., Aranguren F., Brock J. et Salazar M. (2001). A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *Journal of World Aquaculture Society* 32, p.364-372.

Villamil L., Fugueras A., Planas M. et Novea B. (2003). Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture* 219, p.43-56.

Villarino A., Bouvet O.M., Regnault B., Martin-Delautre S. et Grimont P.A.D. (2000). Exploring the frontier between life and death in *Escherichia coli*: evaluation of different viability markers in live and heat- or UV-killed cells. *Research in Microbiology* 151, p.755-768.

- Vinod M.G., Shivu M.M., Umesha K.R., Rajeeva B.C., Krohne G., Karunasagar I. et Karunasagar I.** (2006). Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. *Aquaculture* 255, p.117-124.
- Virgin H.W.S.** (2007). *In vivo* veritas: pathogenesis of infection as it actually happens. *Nature Immunology* 8, p.1143.
- Vodovar N., Acosta C., Lemaitre B. et Bocard F.** (2004). *Drosophila*: a polyvalent model to decipher host-pathogen interactions. *Trends in Microbiology* 12, p.235-242.
- Waechter M., Le Roux F., Nicolas J.L., Marissal E. et Berthe F.** (2002). Characterization of pathogenic bacteria of the cupped oyster *Crassostrea gigas*. *C. R. Biologies* 325, p.231-8.
- Waldor M., Colwell R. et Mekalanos J.** (1994). The *Vibrio cholerae* O139 serogroup antigen includes an O-antigen capsule and lipopolysaccharide virulence determinants. *PNAS* 91, p.11388-11392.
- Waldor M.K. et RayChaudhuri D.** (2000). Bacterial genomics: Treasure trove for cholera research. *Nature* 406, p.469-470.
- Wandersman C. et Delepelaire P.** (2004). Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annual Review of Microbiology* 58, p.611-647.
- Wang Y.B., Li J.R. et Lin J.** (2008). Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture* 281, p.1-4.
- Ward J.R. et Lafferty K.D.** (2004). The Elusive Baseline of Marine Disease: Are Diseases in Ocean Ecosystems Increasing? *PLoS Biol* 2, p.e120.
- Waters C.M. et Bassler B.L.** (2005). QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21, p.319-346.
- Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O., Krichevsky M.I., Moore L.H., Moore W.E.C., Murray R.G.E., Stackebrandt E., Starr M.P. et Trüper H.G.** (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37, p.463-464.
- Weiner R.M., Segall A.M. et Colwell R.R.** (1985). Characterization of a marine bacterium associated with *Crassostrea virginica* (the Eastern oyster). *Applied and Environmental Microbiology* 49, p.83-90.
- Wenne R., Boudry P., Hemmer-Hansen J., Lubieniecki K.P., Was A. et Kause A.** (2007). What role for genomics in fisheries management and aquaculture? *Aquatic Living Resources* 20, p.241-265.
- Weppe M., Bonami J.R., Lightner D.V. et Aquacop** (1992). Demonstration de altas cualidades de la cepa de *P. stylirostris* (SPR 43) resistente al virus IHNV. *Memorias Congreso Ecuatoriano de Acuicultura*, CENAIME, Guayaquil, Ecuador: 229-232p.
- Winstanley C. et Hart C.A.** (2001). Type III secretion systems and pathogenicity islands. *Journal of Medical Microbiology* 50, p.116-126.
- Wirth R., Muscholl A. et Wanner G.** (1996). The role of pheromones in bacterial interactions. *Trends in Microbiology* 4, p.96-103.
- Wright A.C., Simpson L.M., Oliver J.D. et Morris J.G.J.** (1990). Phenotypic evaluation of acapsular transposon mutants of *Vibrio vulnificus*. *Infection and Immunity* 58, p.1769-1773.
- Wyban J. et Swingle J.** (1999). Selective breeding for fast growth and Taura Syndrome resistance in High Health *P. vannamei*. *World Aquaculture Society*, Sydney, Australia: 819p.

-XYZ-

- Yamaichi Y., Iida T., Park K.S., Yamamoto K. et Honda T.** (1999). Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*: presence of two chromosomes in *Vibrio* species. *Mol Microbiol* 31, p.1513-21.
- Yamamoto S. et Harayama S.** (1995). PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 61, p.1104-1109.
- Yamamoto S., Okujo N., Yoshida T., Matsuura S. et Shinoda S.** (1994). Structure and iron transport activity of vibrioferrin, a new siderophore of *Vibrio parahaemolyticus*. *The Journal of Biochemistry* 115, p.868-874.
- Yang H., Chen J., Yang G., Zhang X.-H., Li Y. et Wang M.** (2007). Characterization and Pathogenicity of the Zinc Metalloprotease EmpA of *Vibrio anguillarum* Expressed in *Escherichia coli*. *Current Microbiology* 54, p.244-248.
- Yorimitsu T. et Homma M.** (2001). Na⁺-driven flagellar motor of *Vibrio*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1505, p.82-93.
- Yoshida S., Ogawa M. et Mizuguchi Y.** (1985). Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* 47, p.446-451.
- Yusa Y.** (2007). Causes of variation in sex ratio and modes of sex determination in the Mollusca – an overview. *American Malacological Bulletin* 23, p.89-98.
- Zhang D., Jiang S., Qiu L., Su T., Wu K., Li Y., Zhu C. et Xu X.** (2009). Molecular characterization and expression analysis of the IκB gene from pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish & Shellfish Immunology* 26, p.84-90.
- Zhang X.H. et Austin B.** (2005). Haemolysins in *Vibrio* species. *Journal of Applied Microbiology* 98, p.1011-1019.
- Zhu J., Miller M.B., Vance R.E., Dziejman M., Bassler B.L. et Mekalanos J.J.** (2002). Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, p.3129-3134.

**Multifactorial approaches for interaction studies between Pacific oyster *Crassostrea gigas* and two virulent *Vibrio*, *V. splendidus* and *V. aestuarianus*:
Epidemiology, variable host susceptibility and pathogenesis**

Abstract

Oyster production is the main aquaculture activity in France and is dominated by the rearing of *Crassostrea gigas*. In the aquatic ecosystems where the species is grown, bacteria of the genus *Vibrio* are found to be dominant. Two *Vibrio* species, *V. splendidus* and *V. aestuarianus*, are frequently associated with *Crassostrea gigas* summer mortality episodes. The aims of this work were to study *Vibrio*-oyster interactions and their modulations according to virulence mechanisms and to genetic and physiological parameters of the host. Using specific, sensitive and quantifying diagnostic tools developed in this study, as well as standardized experimental infection trials, some components of the virulence of *Vibrio* strains and host susceptibility were delineated and the dynamics of *Vibrio* infection characterized through pathogenesis studies.

The study of the specific diversity of bacterial strains isolated during summer mortality events, on broad temporal and spatial scales, revealed an epidemiological association of the group *V. splendidus* and the species *V. aestuarianus*. Because a correlation has been observed between pathogenicity and metalloprotease activity, a predictive phenotypic test of virulence was developed. Exploration of the synergy phenomenon between the pathogenicity of the two strains observed in experimental co-injection led to the characterisation of a system of quorum sensing controlling the production and transcriptional expression of the gene encoding metalloprotease Vsm and Vam at the intraspecific (*V. splendidus*) and interspecific level (*V. splendidus/V. aestuarianus*).

The statistical analysis of mortality kinetics in half-sib diploid and triploid families subjected to experimental vibriosis by co-infection revealed an increased susceptibility of oysters during the period of active gametogenesis. The triploid oysters subjected to this same experimental infection did not show any significant advantage. The existence of a genetic basis for oyster susceptibility to experimental vibriosis was illustrated by the evaluation of the susceptibilities of fourteen families of the fifth generation (G5) from a program of divergent selection carried out within the MOREST oyster summer mortality research project. This study also allowed the description of co-infections involving the herpes OsHV-1 virus and *V. aestuarianus*, suggesting multi-etiological summer mortalities.

A pathogenesis study on *V. splendidus* and *V. aestuarianus*, performed by cohabitation, was used to explore interactions between *C. gigas* and pathogenic *Vibrio* (*V. splendidus* and *V. aestuarianus*), or non pathogenic *Vibrio* found naturally in the endogenous flora of the oyster hemolymph or in the water of the aquaria. This new approach demonstrated a fast transmission of pathogenic *Vibrio* between infected oysters and sentinels, in less than two hours. Moreover, a significant early and transient disturbance of the defence response of the host was revealed at the transcriptional level during the first six hours of cohabitation. The differential loads of pathogenic and commensal *Vibrio* in oysters suggest the existence of discriminatory mechanisms, leading to a specificity of the response aiming to eliminate pathogenic *Vibrio* and maintain a potentially beneficial endogenous bacterial flora in *C. gigas*.

**Approches multifactorielles pour l'étude d'interactions entre l'huître creuse *Crassostrea gigas* et deux *Vibrio* pathogènes, *V. splendidus* et *V. aestuarianus* :
épidémiologie, variabilité de la sensibilité de l'hôte et pathogénèse.**

Résumé

L'ostréiculture, dominée par l'élevage de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, représente plus de 70% du chiffre d'affaire réalisé par l'aquaculture française. Au sein des écosystèmes aquatiques, les bactéries appartenant au genre *Vibrio* forment l'un des groupes bactériens les plus abondamment représentés. Deux espèces, *Vibrio splendidus* et *Vibrio aestuarianus*, sont fréquemment associées et de façon récurrente, à des mortalités sévissant dans les élevages d'huître creuse *Crassostrea gigas*, le plus souvent en période estivale. Ce travail de thèse avait pour objectifs d'étudier des interactions *Vibrio*-huître et leurs modulations en fonction de la virulence des pathogènes et des paramètres génétiques et physiologiques de l'hôte. Le développement d'outils de détection et de quantification sensibles et spécifiques et la maîtrise de protocoles d'infection expérimentale à *Vibrio* ont permis d'explorer des mécanismes de virulence, d'étudier la variabilité de la sensibilité des huîtres à ces *Vibrio* et de caractériser la pathogénèse.

L'étude de la diversité spécifique des souches bactériennes isolées dans un contexte de mortalité estivale sur une large échelle de temps et d'espace a permis de montrer la prédominance épidémiologique du groupe *V. splendidus* et de l'espèce *V. aestuarianus* associée aux épisodes de mortalité estivale de *C. gigas* en France. Une corrélation ayant été observée entre pouvoir pathogène et activité métalloprotéasique, un test phénotypique prédictif de la virulence des souches a été proposé. L'exploration du phénomène de synergie dans la pathogénicité des deux souches observé en co-injection expérimentale a conduit à la mise en évidence de l'existence d'un système de quorum sensing régulant aux niveaux intraspécifique (*V. splendidus*) et interspécifique (*V. splendidus/V. aestuarianus*) la production et l'expression au niveau transcriptionnel des gènes codant les métalloprotéases Vsm et Vam des deux souches étudiées.

L'analyse statistique des cinétiques de mortalité obtenues chez des familles de demi-frères diploïdes et triploïdes soumises à un protocole de co-infection standardisée révèle une sensibilité accrue des huîtres à cette vibriose expérimentale, en période de gamétogenèse active. Les huîtres triploïdes soumises à cette même infection expérimentale n'ont présenté aucun avantage significatif. L'existence d'une base génétique de la sensibilité des huîtres aux vibrioses expérimentales a été illustrée par l'évaluation des sensibilités de quatorze familles de la cinquième génération (G5) issue du programme de sélection divergente réalisée dans le cadre de MOREST. Cette étude a également permis la description de co-infections à herpès virus OsHV-1 et *V. aestuarianus* suggérant une multi-étiologie des phénomènes de mortalité estivale.

Une étude de pathogénèse à *V. splendidus* et *V. aestuarianus* réalisée par cohabitation a visé l'exploration des interactions liant l'huître creuse *C. gigas* et les *Vibrio* virulents, *V. splendidus* et *V. aestuarianus*, ou non virulents présents naturellement dans la flore endogène de l'hémolymphe ou dans l'eau des aquariums. Cette nouvelle approche a permis de mettre en évidence la rapidité de transmission des *Vibrio* virulents des huîtres infectées aux huîtres sentinelles en moins de deux heures, accompagnée d'une perturbation significative, précoce et transitoire de la réponse immunitaire de l'hôte au niveau transcriptionnel au cours des six premières heures de cohabitation. La prise en charge différentielle des *Vibrio* pathogènes et des *Vibrio* commensaux par l'huître suggère l'existence de mécanismes conduisant à une spécificité des réponses de l'huître visant l'élimination des *Vibrio* pathogènes et le maintien d'une flore vibriocécée endogène probablement bénéfique pour *C. gigas*.