



THESE / UNIVERSITE DE BREST
sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne
pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BREST
Mention : Microbiologie
Ecole Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

Afi AZANDEGBE

Préparée à l'Unité Mixte de recherche : PE2M

Etablissement de rattachement : IFREMER

Nom développé de l'unité : Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins

Intitulé de la thèse

« Etude de la structure des communautés bactériennes du sédiment et de l'écologie de *Vibrio aestuarianus* pathogène de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans deux sites ostréicoles »

Thèse soutenue le 29 avril 2010

devant le jury composé de :

Nathalie Cochenec

HDR, directeur de recherches, Ifremer, Nantes / *rapporteur*

Rutger De Wit

Directeur de recherche CNRS : Ecolag, UMR 5119 Université Montpellier 2 / *rapporteur*

Michel Auffret

Professeur UBO, LEMAR, , IUEM / *examineur*

Daniel Prieur

Professeur UBO, LEMAR, IUEM / *examineur*

Franck Poly

HDR, CR CNRS / Université de Lyon 1 / *examineur*

Jean-louis Nicolas

HDR Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, Ifremer, Brest / *Directeur de thèse*





THESE / UNIVERSITE DE BREST
sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne
pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BREST
Mention : Microbiologie
Ecole Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

Afi AZANDEGBE

Préparée à l'Unité Mixte de recherche : PE2M

Etablissement de rattachement : IFREMER

Nom développé de l'unité : Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins

Intitulé de la thèse

« Etude de la structure des communautés
bactériennes du sédiment et de l'écologie de *Vibrio*
aestuarianus pathogène de l'huître creuse
Crassostrea gigas dans deux sites ostréicoles »

Thèse soutenue le 29 avril 2010

devant le jury composé de :

Nathalie Cochenec

HDR, directeur de recherches, Ifremer, Nantes / *rapporteur*

Rutger De Wit

Directeur de recherche CNRS : Ecolag, UMR 5119 Université Montpellier 2 / *rapporteur*

Michel Auffret

Professeur UBO, LEMAR, , IUEM / *examineur*

Daniel Prieur

Professeur UBO, LEMAR, IUEM / *examineur*

Franck Poly

HDR, CR CNRS, Université de Lyon 1 / *examineur*

Jean-louis Nicolas

HDR Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, Ifremer, Brest/ *Directeur de thèse*



Ifremer



REMERCIEMENTS

Que toutes les personnes physiques ou morales citées ci-après voient par-là l'expression de ma profonde gratitude !

A la Région Bretagne et à l'Ifremer qui ont financé cette thèse et à l'Université de Bretagne Occidentale

A mon directeur de thèse M. Jean-louis Nicolas, pour m'avoir permis de faire cette thèse et pour l'aide qu'il m'aura apporté durant ces trois années,

Je remercie les rapporteurs Mme Cochenec et M. De Wit ainsi que tous les autres membres du jury d'avoir accepté de porter un œil scientifique sur mon travail de thèse.

A tous mes collègues du Laboratoire de Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins (LPI et ARN),

Aux collègues de l'équipe Dyneco (Françoise, Roger, Agnès et Xavier)

A Dominique Hervio pour son aide et sa présence permanente

A Franck Poly pour m'avoir conseillé et orienté dans les expériences et les analyses

A Matthieu Garnier et Didier Flament pour m'avoir soutenu et réconforté par moment

Un grand merci à Marie-Josée Garet-Delmas qui m'a été d'une aide précieuse durant la dernière année, ainsi qu'à Daniel Delmas dont les conseils et corrections ont été très importants lors de la rédaction,

A Phillippe Miner pour ta présence et ton aide,

A tous mes jeunes collègues et autres thésards avec qui j'ai beaucoup partagé, je nomme Magalie, Aurélie (merci pour tes corrections éclairées), Florian (bon courage pour la suite héhéhé), Julien (oh Juju, tu m'as foutu les boules la dernière semaine avec tous ces remaniements mais grâce à toi j'ai un M/s presque parfait), Diana (enfin je suis libre, je passe te voir), Mariuxi, Isabelle, Mohamed (je te quitte et oui, c'est comme ça, mais en tout cas tu m'auras fait marrer. Merci pour ton soutien. Je ne peux que te souhaiter du courage car je sais combien tu en auras besoin), Delphine (tu m'as lâché mais j'ai réussi à finir), Sophie, Yann et Yoann, merci à vous pour votre soutien et aux soirées passées

A ma famille présente ici et ailleurs (Agnès, Théodore, Yoni, Cila, Nadou, Mawuena, Paula, Nicole) pour m'avoir soutenu, je vous dis un grand Merci,

A mes amis qui malgré mon caractère de pitbull dû à cette satanée thèse m'ont supporté pendant toutes ces trois années, je cite Mireille-Anne, Rhadia, Ché, thomas,

A Emmanuel, sans qui la fin de cette thèse aurait été une vraie catastrophe. Pour ton aide, ton soutien, ta bonne humeur merci merci merci.....

A ma grand-mère, et pour toute l'éducation qu'elle m'a donnée et à mon père qui aurait été si fier de moi

Introduction générale et objectifs	1
Introduction Générale	2
I Contexte général	2
II. Problématique de l'étude et objectifs	6
III. Choix méthodologiques	8
Données Bibliographiques	13
Les bactéries du genre <i>Vibrio</i>	14
I Caractéristiques biologiques	14
I-1 Généralités	14
I-2 Taxonomie	14
II Ecologie du genre <i>Vibrio</i>	21
II-1 Généralités sur l'écologie du genre <i>Vibrio</i>	21
II-2 Stratégies de prolifération et d'adaptation dans l'environnement	22
II-2-1 Le Quorum-Sensing	22
II-2-2 L'état viable mais non cultivable ou VBNC (Viable But Non Cultivable)	24
II-2-3 Attachement aux surfaces et formation de biofilm	27
II-4 Rôle de la chitine	29
III Interaction <i>Vibrio</i> –Environnement–Hôte	31
III-1 La symbiose	31
III-2 La pathogénie:	33
III-2-1 Les pathogènes de l'humain	33
III-2-2 Les pathogènes des vertébrés marins	36
III-2-3 Les pathogènes de coraux	37
III-2-4 Pathogènes des invertébrés marins	37
VI Conclusion du chapitre	41
L'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	42
I Généralités	42
II. Caractéristiques biologiques	42
II.1. Reproduction	44
II.2. Le système immunitaire des mollusques bivalves : chez l'huître <i>C. gigas</i>	45
La Phagocytose	48
III. Conclusion du chapitre	50
Les sédiments	52
I. Généralités	52
II. Les cycles biogéochimiques	53
II.1 Le cycle du carbone	53
II.2 Cycle de l'Azote :	54
II.3 Le cycle du soufre :	55
II.4 Le cycle du phosphore :	57
III Les bactéries du sédiment	57
III.1 Les populations bactériennes des sédiments	57
III.2. Les types de bactéries selon leur métabolisme	58
IV. Méthodes d'analyses en microbiologie du sédiment :	61
IV.1. Le dénombrement	63
IV.2. Les activités bactériennes	66
IV.3. L'étude de la diversité bactérienne	67

Chapitre 1 : Sites d'étude, échantillonnage et caractéristiques physico-chimiques	74
Introduction	75
I. Les sites d'études	76
I.1. La rivière d'Auray	76
I.2 Le site de l'aber Benoît	77
I.3 Les échantillonnages	80
I.3.2 Prélèvement et traitement des sédiments	80
II Les caractéristiques physico-chimiques du sédiment	83
II.1 Matériels et méthodes	83
II.1.2 Analyses physiques	83
II.1.3 Analyses chimiques	83
II.1.4 Calcul des flux d'ammonium, de sulfure et de nitrate	83
II.2 Résultats	84
II.2.3 Flux d'ammonium et sulfure dans les sédiments	93
II.3 Discussion	94
Conclusion	97
Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments (Article 1)	100
Introduction	102
1. Matériel et méthodes	102
2. Résultats et discussion	108
Conclusion	115
3. Article 1 (<i>in prep</i>) : Impact of oyster activities on sediment bacterial structure in two farms in France	117
Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> : étude de l'écologie de <i>Vibrio aestuarianus</i> (Articles 2 et 3)	142
Introduction	143
I. Article 2 : Ecologie de <i>Vibrio aestuarianus</i> pathogène de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	145
II. Caractérisation des différents isolats de <i>V. aestuarianus</i>	168
II-1 Matériels et Méthodes	168
II-1-1 Isolement des souches	168
II-1-2 confirmation de l'appartenance à l'espèce <i>V. aestuarianus</i>	168
II-1-3 Caractérisations des souches	170
Test azocaséine	170
II-2 Résultats	171
II-2-1 Isolement des souches	171
II-2-2 confirmation de l'appartenance à l'espèce <i>V. aestuarianus</i>	172
II-3 Discussion	178
III. Circulation de <i>V. aestuarianus</i> entre le sédiment, l'eau de mer <i>C. gigas</i> : expériences en microcosmes (article 3)	181
Conclusion	201
Discussion générale & perspectives	210

Discussion générale et perspectives	211
<i>Annexe</i>	220
<i>Références bibliographiques</i>	226

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

ARN : Acide Ribonucléique

C: Carbone

cm: Centimètre

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DNTP: DésoxyNucléotide TriPhosphate

ECP: ExtraCellular Products

FISH: Fluorescent in situ hybridization

GFP: Green Fluorescence Protein

MDS: Multi-Dimensional Scaling

mm: Millimètre

MSHA: Mannose Sensitive Hemagglutinin

nm: nanomètre

N: Azote

NO₃: Nitrate

ORF: Open Reading Frame

PCR: Polymerase Chain reaction

QS : Quorum Sensing

RT-PCR : Real-Time Polymerase Chain Reaction

SDS : Sodium Docecyl Sulfate

TAE : Tris Acétate EDTA

TBE : Tris Borate EDTA

TCP: Toxin Co-regulated Pilus

UE: Union européenne

Vam: *Vibrio aestuarianus* metalloprotease

INDEX DES FIGURES

Figure 1 Arbre phylogénique simplifié montrant le genre <i>Vibrio</i> par rapport à d'autres groupes (adapté de (Giovannoni & Rappé, 2000)	15
Figure 2 : Arbre phylogénétique des <i>Vibrio</i> basé sur les séquences concaténées des gènes <i>rpoA</i> , <i>recA</i> et l'ADNr 16S (Thompson, Iida et al. 2004)	17
Figure 3: Schéma de la régulation du QS chez <i>Vibrio fischeri</i> . A) et C) vue schématique de la relation poisson- <i>Vibrio</i> . B) et D) régulation simplifiée du gène de bioluminescence chez les <i>Vibrio</i> à B) faible densité cellulaire et D) forte densité cellulaire (Uroz <i>et al.</i> , 2009).....	24
Figure 4: Photos d'électromicroscopie à balayage de cellules de <i>V. cincinnatiensis</i> VIB 287. (a) : les cellules normales ; (b) : les cellules VBNC ; (c) et (d) : electromicroscopie à transmission des cellules normales et des cellules VBNC respectivement. (Zhong <i>et al.</i> , 2009).....	26
Figure 6 : Schéma d'un model de du processus de formation d'un biofilm dans l'environnement. Sous l'action de la MSHA, les cellules planctoniques s'agrègent en monocouche à la rencontre d'une surface. Dès lors, elles perdent leurs flagelles et la dégradation des nutriments présents sur la surface génère un signal pour la progression du biofilm.....	29
Figure 7 : Impact de l'interaction <i>V. cholerae</i> -chitine à différentes échelles dans l'environnement : la réponse cellulaire (multiplication cellulaire, chimiotactisme, compétence), la formation de biofilm, l'association aux organismes possédant la chitine, le cycle du carbone et de l'azote et la pathogénie envers l'humain.....	31
Figure 8 : Symbiose <i>V. fischeri</i> - <i>Euprymna scolopes</i> . a) Individu adulte de <i>E. scolopes</i> ; la position approximative de l'organe luminescent dans la cavité du manteau est indiquée par le cercle. b) Une coupe ventrale de l'organe : les petites flèches indiquent les positions des pores et la grande flèche montre l'évacuation du contenu de la cavité. c) Coupe schématique de l'organe luminescent juvénile. A gauche : stade précoce. A droite : stade tardif dans la symbiose. d) : Microscopie confocale montrant l'agrégation des cellules de <i>V.fischeri</i> dans le mucus à côté du pore pendant l'initiation de la symbiose (Visick & Ruby 2006).....	32
Figure 9 : Plan d'organisation d'un <i>Crassostreidé</i> (valve gauche) (Galtsoff, 1964).....	43
Figure 10 : représentation schématique du système circulatoire de <i>Crassostrea gigas</i> (Bachere <i>et al.</i> , 2004)	44
Figure 11: Cycle de développement de <i>Crassostrea gigas</i>	45
Figure 12: Les types d'hémocytes présents chez <i>Crassostrea gigas</i> . A- hyalinocytes; B- granulocytes (Bachère <i>et al.</i> , 2004).....	48

Figure 13: Les différents processus d'internalisation lors de la phagocytose par les hémocytes. A: les particules entrent dans les phagosomes par l'intermédiaire de pseudopodes ; B : vacuoles d'endocytose qui englobent les particules après leur adhésion à la surface de la cellule ; C : des pseudopodes qui entourent les particules, qui sont ensuite englobées dans des phagosomes. (Cheng, 2000).....	49
Figure 14 : Processus diagénétiques dans les sédiments côtiers.....	53
Figure 15 : Représentation du cycle du carbone.....	54
Figure 16: Représentation du cycle de l'azote.....	55
Figure 17: Représentation du cycle du soufre.....	56
Figure 18 : Méthodes d'analyse des bactéries du sédiment (Neto, 2007)	62
Figure 19: Récapitulatif des différentes étapes dans la DGGE et les différentes analyses.....	71
Figure 20 : Représentation du site ostréicole du Fort-Espagnol et de la rivière d'Auray situés dans la partie sud du golfe du Morbihan.....	77
Figure 21 : Représentation du site ostréicole de Vivier de Beg ar vil et de l'Aber-Benoît situé au nord-ouest du finistère	79
Figure 22 : Procédures d'analyses physico-chimiques	82
Figure 24 : Rapport C/N (organique) dans les sédiments pour les sites sous tables et hors tables de l'aber Benoît et de la rivière d'Auray tout au long de la période d'étude (Juillet, Août et Septembre 2007 et Mars, Mai et Juin 2008). <i>Les rapports sont exprimés en mol/mol</i>	88
Figure 25 : Distribution de la chlorophylle <i>a</i> dans les sédiments pour les sites hors tables et sous tables de l'aber Benoît et de la rivière d'Auray tout au long de la période d'étude (Juillet, Août et Septembre 2007 et Mars, Mai et Juin 2008). <i>Les concentrations sont exprimées en $\mu\text{g g}^{-1}$ de sédiment</i>	89
Figure 26 : Profils verticaux d'oxygène en fonction de la profondeur à l'interface eau-sédiment sur les sites de l'aber Benoît et de la rivière d'Auray pour les sites hors tables et sous tables tout au long de la période d'étude (résolution de 100 μm à proximité de l'interface). <i>Les concentrations sont exprimées en $\mu\text{mol l}^{-1}$</i>	90
Figure 27 : Distribution du phosphate dans les eaux interstitielles pour les sites hors tables et sous tables de l'aber Benoît et de la rivière d'Auray tout au long de la période d'étude (juillet, mars et septembre 2007 et mars, mai et juin 2008). <i>Les concentrations sont exprimées en $\mu\text{mol l}^{-1}$</i>	91
Figure 28 : Distribution de l'ammonium dans les sédiments pour les sites hors tables et sous tables de l'aber Benoît et de la rivière d'Auray tout au long de la période d'étude (Juillet, Mars et Septembre 2007 et Mars, Mai et Juin 2008). <i>Les concentrations sont exprimées en $\mu\text{mol l}^{-1}$</i>	92
Figure 29 : Distribution des sulfures dans les eaux interstitielles pour les sites hors tables et sous tables de l'aber Benoît et de la rivière d'Auray tout au long de la période d'étude (Juillet, Mars et Septembre 2007 et Mars, Mai et Juin 2008). <i>Les concentrations sont exprimées en $\mu\text{mol l}^{-1}$</i>	93

Figure 30 : exemple de matrice générée avec le logiciel Gelcompar	106
Figure 31 : Photos de gel DGGE représentant les profils des populations de <i>Vibrio</i> dans les sédiments collectés sous table et en dehors des tables à l'Aber-Benoît et à la Rivière d'Auray en 2007. Les 4 bandes notées B1 à B4 sont les bandes dominantes dans les sédiments des deux sites.	109
Figure 32: Photos de gels DGGE des échantillons prélevés au cours des quatre mois de l'été 2007 dans la rivière d'Auray, correspondant aux profils (Tripliquats) des échantillons prélevés en dehors des tables et ceux prélevés sous les tables	110
Figure 33 : Graphiques de corrélation entre les différents paramètres des sédiments à l'aber Benoît et en rivière d'Auray. Les coefficients de corrélations pour les corrélations significatives sont indiqués sur le graphe.....	112
Figure 34: MDS de l'influence de la température et du flux de nitrates sur la structure de la communauté bactérienne du sédiment de l'aber Benoît aux mois de juin à septembre 2007 et en 2008 (le diamètre des cercles étant proportionnel à la valeur de la variable représentée).....	113
Figure 35 : MDS de l'influence de la température et du flux de nitrates sur la structure de la communauté bactérienne du sédiment de la Rivière d'Auray aux mois de juin à septembre 2007 (le diamètre des cercles étant proportionnel à la valeur de la variable représentée).....	114
Figure 36. Representation of Aber-Benoît (A) Rivière d'Auray in the golf du Morbihan (B). Locations of sampling sites are indicated by arrows.....	121
Figure 37: DGGE profiles of sediments samples in Aber-Benoît in 2007 (a) and in Rivière d'Auray in 2008 (b). The sequenced bands are numbered	129
Figure 38 : MDS map from DGGE bands profiles of (A) all 24 samples of 2007 and (B) all 32 samples of 2008, showing spatial and temporal variations of bacterial diversity in the sediment of Aber-Benoît	133
Figure 39 : MDS map from DGGE bands profiles of (A) all 24 samples of 2007 and (B) all 32 samples of 2008, showing spatial and temporal variations of bacterial diversity in the sediment of Rivière d'Auray.....	134
Figure 40 : Fréquence des espèces bactériennes isolées dans les huîtres moribondes dans les parcs ou les nurseries lors d'évènements de mortalités estivales (Samain & McCombie, 2008)	144
Figure 41 : Culturable heterotrophic bacteria, TCBS <i>Vibrio</i> and <i>V. aestuarianus</i> counts in sediment (1) and the haemolymph (2) of oysters in Aber-Benoît over time. The water temperature on sampling dates is shown.	156
Figure 42 : Culturable heterotrophic bacteria, TCBS <i>Vibrio</i> and <i>V. aestuarianus</i> counts in sediment (1) and the haemolymph (2) of oysters in Rivière d'Auray over time. The water temperature on sampling dates is shown.....	157

Figure 43 : Activités protéoasiques des surnageants de culture des différents isolats. En noir : les souches du sédiment. En hachuré : les souches d'huîtres moribondes. En grisé : les souches d'huîtres vivantes	175
Figure 44 : Cinétiques des mortalités de <i>C. gigas</i> injectées au niveau du muscle adducteur (10^8 bactéries par huître, trois réplicats de 20 huîtres testées par souche et deux réplicats de 20 huîtres pour le témoin EMSF.....	177
Figure 45 Représentation des expériences en microcosme. Les bacs I ($\times 3$) servent à l'étude du transfert de <i>V. aestuarianus</i> de l'eau vers le sédiment, mais aussi vers les huîtres. Dans les bacs II ($\times 3$), la bactérie GFP est ajoutée au sédiment pour étudier le passage vers l'eau de mer. Les bacs III servent de témoins dans lesquels aucune bactérie GFP n'a été ajoutée.....	182
Figure 46 : Experiment 1-challenge 1: Variation in the concentrations of 02/041-GFP in seawater, sediment, digestive gland and the haemolymph of oysters (seawater infected with 2×10^6 CFU ml ⁻¹). The values represented in the graphs are means of the concentrations recorded in the tank Ia and Ib on each sampling date. The standard deviations are represented. The arrows indicate the change of the seawater in each tank	190
Figure 47 : Experiment 1- Challenge 2: Variation in the concentrations of 02/041-GFP in seawater, sediment, digestive gland and the haemolymph of oysters (sediment infection by 2×10^6 02/041-GFP CFU g ⁻¹). The values represented in graphs are means of the concentrations recorded in the tanks IIa and IIb each sampling date. The standard deviations are represented. The arrows indicate the change of the seawater in each tank.	192
Figure 48 : Means accumulated mortalities in the experiment 1 performed to verify the filtration of 02/041-GFP by <i>C. gigas</i> . When seawater was infected or when sediment was infected. In control condition, no 02/041-GFP was added. The values in the profiles are the means of accumulated mortalities, which occurred in two parallel tanks. The error bars are represented	193
Figure 49 : Experiment 2: Variation in the concentration of fluorescent 02/041-GFP in the seawater, the sediment and alive pre-inoculated oysters. Values represented in the graphs are means concentrations of recorded in the replicates. Errors bars are represented	195
Figure 50 : Représentation schématique du cycle vital de <i>Vibrio. aestuarianus</i> pathogène de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	217
Figure 51 : Distribution du carbone organique dans les sédiments pour les sites sous tables et hors tables de l'Aber Benoît et de la Rivière d'Auray tout au long de la période d'étude (Juillet, Août et Septembre 2007 et Mars, Mai et Juin 2008). Les concentrations sont exprimées en $\mu\text{mol g}^{-1}$	221
Figure 52 : Distribution de l'azote organique dans les sédiments pour les sites sous tables et hors tables de l'Aber Benoît et de la Rivière d'Auray tout au long de la période d'étude (Juillet, Août et Septembre 2007 et Mars, Mai et Juin 2008). Les concentrations sont exprimées en $\mu\text{mol g}^{-1}$	221
Figure 53 : Comparaison saisonnière des flux hors tables et sous tables du site de l'Aber Benoît (A= Phosphate (PO_4^{3-}); B= Ammonium (NH_4^+); C= Sulfure (HS^-))	222

Figure 54 : Comparaison saisonnière des flux hors tables et sous tables du site de la Rivière d'Auray
(A= Phosphate (PO_4^{3-}) ; B= Ammonium (NH_4^+); C= Sulfure (HS^-)).....223

INDEX DES TABLES

Tableau 1 : Présentation des caractéristiques moléculaires de quelques espèces de <i>Vibrio</i> adaptée de Grimes <i>et al.</i> , (2009)	20
Tableau 2 : Synthèse des différentes espèces pathogènes des larves de bivalves, leurs hôtes et les symptômes associés	39
Tableau 3 : Quelques exemples de sondes oligonucléotides pour la détection de bactéries (Pour les séquences, se référer aux références indiquées).....	66
Tableau 4 : Caractéristiques des techniques de biologie moléculaire couramment utilisées en écologie microbienne pour l'étude de la diversité bactérienne d'un environnement.	68
Tableau 5: Intervalles de variation de quelques paramètres mesurés dans le sédiment (5 premiers centimètres) en 2007 et en 2008 en aber Benoît et en rivière d'Auray	85
Tableau 6 : Caractéristiques des sédiments de surface (3 premiers centimètres) sauf pour la porosité (couche 0-1 cm) et la granulométrie (couche 0 – 2 cm) sur les sites de l'Aber Benoît et de la Rivière d'Auray pour les 2 années confondues. Les moyennes des mesures sont en caractère gras et les écarts-types entre parenthèses	86
Tableau 7 : Intervalles de variation de quelques paramètres mesurés dans le sédiment (5 premiers centimètres) en 2007 et en 2008 en aber Benoît et en rivière d'Auray.....	87
Tableau 8 : Conditions et réactifs des réactions PCR	104
Table 9: Main biogeochemical characteristics of the sediment of Aber-Benoît. Values of NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} are means of calculated fluxes of three replicates and the values of the HS^- are calculated fluxes of one sediment sample. The values in parentheses are the standard error of the mean. TOC, total organic carbon.....	126
Table 10: Main biogeochemical characteristics of the sediment of Rivière d'Auray. Values of NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} are means of calculated fluxes of three replicates and the values of the HS^- are calculated fluxes of one sediment sample. The values in parentheses are the standard error of the mean. TOC, total organic carbon.	127
Table 11: Sequence analysis of bands excised from DGGE gels of Aber-Benoît sediment	130
Table 12: Sequence analysis of bands excised from DGGE gels of Rivière d'Auray sediment.....	131
Table 13 : Results of multiple regression analysis of log ₁₀ cultural <i>V. aestuarianus</i> counts in haemolymph and sediment versus environmental parameters at Aber-Benoît (AB) and Rivière d'Auray (RA).	160
Table 14 : Results of multiple regression analysis of log ₁₀ cultured <i>Vibrio</i> ssp counts in haemolymph and sediment versus environmental parameters at Aber-Benoît (AB) and Rivière d'Auray (RA) ...	160
Tableau 15 : Amorces utilisées pour les amplifications et tailles des fragments attendus	170
Tableau 16 : Les différents isolats et les résultats des PCR et des blasts	174

ABSTRACT

Since several years, the French oyster farming copes with high mortality affecting juveniles and some adults of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Studies conducted in the framework of a multidisciplinary project (MOREST) showed that mortality was related to several factors like physiological and genetic status of oyster, pathogens including bacteria of the genus *Vibrio*, and revealed that the sediment, on which the oyster cages are installed, might play a particular role. This has been suggested because of the concomitance of the mortalities and increased toxic compounds like ammonia and sulphides in the sediment. Moreover, the presence of *Vibrio* bacteria in the sediment indicates a dual role of sediment in the mortality onset.

The physico-chemical parameters, the structure of bacterial communities and the abundance of *Vibrio aestuarianus*, pathogen of *C. gigas*, have been determined in sediments below oyster tables and outside tables of the Aber Benoit (Nord-Finistère, French Atlantic coast) and Auray River (Gulf of Morbihan) in different seasons for 2 years.

This work confirms the existence of a role of sediment risk and also the influence of oyster tables on sediment biogeochemistry. Indeed, high concentrations of ammonia and sulphides have been recorded in sediments under the tables of both sites. In the AberBenoît, the impact of oyster tables on the sediment biogeochemistry was more evident whereas the bacterial community structure showed certain stability. The microflora of sediments of the Auray River appeared more dynamic and was influenced by external inputs. These results demonstrate the importance of the characteristics related to each site in the response of bacterial communities following a disturbance.

Furthermore, members of *Vibrionaceae* group were scarce in the sediments. Partial 16S rRNA gene sequences of two pathogenic species, namely *V. ordalii* and *V. aestuarianus*, were detected, suggesting that they were part of the dominant community in the sediment.

The study of the ecology of *V. aestuarianus* showed that it was present in the sediment during cold and warm seasons. However, presence of *V. aestuarianus* in sediment was not correlated to its abundance in oysters. Experiments conducted in microcosms with a GFP-transformed strain of *V. aestuarianus* showed that this bacterium could easily circulate between the sediment, the seawater and oysters and induce mortalities. Our results highlight the important of sediment as a reservoir of *V. aestuarianus*.

Keywords: Oyster, *Crassostrea gigas*, bacteria, *Vibrio aestuarianus*, ecology, sediment, ammonia, sulphide

Introduction générale et objectifs

Introduction Générale

I Contexte général

I.1. Généralités sur l'ostréiculture

Le terme aquaculture regroupe la culture d'organismes aquatiques tels que les poissons, les mollusques, les crustacés et même les plantes aquatiques. Selon les données du FAO, la production mondiale de l'aquaculture en 2007 s'élève à 50 329 007 tonnes de produits. La production de l'huître creuse *Crassostrea gigas* occupe la première place avec 4 233 829 tonnes.

Parmi les pays de l'UE, l'industrie aquacole française a été l'une des premières à se développer et constitue aujourd'hui un secteur bien établi. 243 907 tonnes ont été produites en 2004, plaçant ainsi la France en deuxième position parmi les plus grands producteurs en termes de volume en Europe. La production marine est dominée par les mollusques; principalement l'huître avec 106 750 tonnes et les moules avec 74 100 tonnes générant un revenu brut d'environ 600 millions € et 20 000 emplois dans 3 700 exploitations aquacoles. En Europe, l'ostréiculture remonte à une époque très ancienne sur l'initiative des romains et se focalisait sur la culture de l'espèce endémique de l'huître plate, *Ostrea edulis*. Les stocks cultivés de cette espèce furent toutefois en grande partie dévastés par des épisodes de mortalités provoqués par les parasites, *Marteilia refringens* (1968) et *Bonamia ostreae* (1979 et 1990). Cependant, bien avant le déclin de cette espèce endémique, *Crassostrea angulata* fut introduite dans le bassin d'Arcachon au milieu du 19^{ème} siècle. Elle s'implanta avec succès dans les années suivantes et devint une espèce dominante des écosystèmes côtiers du littoral atlantique français, ainsi que la principale espèce d'huître cultivée (Héral, 1989). Cette espèce fut à son tour décimée dans les années 1970 par un virus de type irodovirus qui provoque la maladie des branchies et du tissu conjonctif (Comps *et al.*, 1976). C'est alors que l'espèce *Crassostrea gigas* fut importée du Japon et de la Colombie britannique dans le but de soutenir les professionnels et permettre à nouveau le captage des larves. Comme ce fut le cas pour *Crassostrea angulata*, l'acclimatation de cette espèce exotique sur le littoral français fut rapide et contribua grandement au développement actuel de l'ostréiculture française (<http://www.FAO.org>).

I.2. Les mortalités estivales

L'ostréiculture est pourtant sous la contrainte de phénomènes de mortalités récurrents, qui influencent le rendement de production et la stabilité économique de cette filière. L'espèce *C. gigas* avait déjà été sujette à des mortalités au Japon dès 1945 (Koganazawa, 1975), puis plus tard aux Etats-Unis (Cheney *et al.*, 2000; Glude, 1975) et en Europe (Gouilletquer *et al.*, 1998). En France, des

Introduction générale et objectifs

mortalités chroniques ont touché cette espèce dès son introduction, affectant le naissain et les adultes de certains cheptels (Cheney *et al.*, 2000; Maurer *et al.*, 1986b). Les taux de mortalités sont très variables, allant de quelques pour cents à plus de 90 % selon les lots et l'âge des individus (Goulletquer *et al.*, 1998; Maurer & Comps, 1986).

En France, ces mortalités sont apparues sur divers sites ostréicoles de la façade Atlantique, dont le Bassin d'Arcachon (Maurer *et al.*, 1986b). Elles se manifestent en période estivale dans le milieu naturel, de façon chronique ou à l'occasion de crises importantes, comme celles survenues en mai 1988 et en juin 1993.

Les causes exactes de ces mortalités restent toutefois méconnues. En 2001, un programme multidisciplinaire nommé « Morest » (pour Mortalités Estivales) a vu le jour sur l'initiative de l'Ifremer dans le but de déterminer les causes de ces mortalités. Ces études ont montré que leur déclenchement était conditionné par des phénomènes d'interactions complexes entre différents facteurs de risque de l'environnement, de l'hôte et du pathogène. Les mortalités qui sont survenues récemment en 2008 et 2009 sont d'une grande ampleur et coïncident avec l'apparition d'un variant du virus herpès dénommé « microvar ».

I.3. Les facteurs de risque

I.2.1. Les facteurs liés à l'hôte

Tout d'abord, certains caractères de l'huître creuse varient fortement au cours de l'année, et selon les sites d'élevage et ceci semble influencer de façon importante la survie des lots. Par exemple, la résistance aux mortalités estivales semble fortement déterminée génétiquement, ainsi que l'ont montré les programmes de sélection divergente réalisés au cours de Morest.

Par ailleurs, la physiologie de *C. gigas* détermine également une grande part de la variation pour la survie. Ainsi il semble que la forte allocation à la reproduction de l'huître se traduise par des effets délétères sur la survie et l'hypothèse d'un effort de reproduction trop coûteux, affaiblissant les capacités de défense, est fréquemment avancée (Berthelin *et al.*, 2000; Samain *et al.*, 2004; Soletchnik *et al.*, 1996b).

Entre la fin du printemps et l'été se produisent deux processus physiologiques importants tels que la gamétogénèse et l'émission des gamètes. La production de tissus reproducteurs implique des synthèses cellulaires et des processus de maturation coûteux en énergie. Ces besoins métaboliques se traduisent par l'augmentation de la respiration et l'utilisation des réserves énergétiques. La fin du printemps pourrait donc constituer une période de faiblesse physiologique pour les huîtres car celles-

Introduction générale et objectifs

ci épuiserait leurs réserves sans apport supplémentaire de phytoplancton. Par ailleurs, les hémocytes qui sont des acteurs à la fois des échanges énergétiques et de la défense immunitaire de l'huître, sont activement sollicités pendant la gamétogenèse. Par conséquent, la période de maturation/maturité sexuelle pourrait entraîner un affaiblissement du système immunitaire, rendant l'huître plus sensible à tout stress extérieur comme les pathogènes (Samain *et al.*, 2007).

D'autre part, les études menées en écophysiologie ont montré que l'allocation aux différentes fonctions physiologiques de l'huître creuse *C. gigas* variait en fonction des conditions de l'environnement telles que la température mais surtout la concentration en phytoplancton (Enriquez-Diaz, 2004; Pouvreau *et al.*, 2006). Dans les limites physiologiques de l'espèce, la quantité de tissus reproducteurs produite est ainsi positivement corrélée avec la disponibilité de la ressource trophique et les processus métaboliques sont exacerbés lorsque la température de l'eau augmente à 19° C et au-dessus. Dans ce contexte, il est probable que la température et la disponibilité en nourriture déterminent en partie la résistance des individus aux mortalités estivales, par leur action indirecte sur la production de tissus reproducteurs et le métabolisme général. Par ailleurs, d'autres facteurs environnementaux sont susceptibles d'influencer l'état de santé de l'hôte, et sa résistance à un stress extérieur, indépendamment de l'effet sur la reproduction. La proximité du sédiment peut ainsi constituer une source de stress pour les individus (cet aspect sera détaillé dans un autre paragraphe), tout comme la pollution, la concentration de l'oxygène dans l'eau, (Le Moullac *et al.*, 2007), etc.

I.2.2. Les pathogènes :

Excepté le cas de *Mikrocytos mackini*, il n'existait pas d'autres maladies décrites de l'espèce *C. gigas* à l'état adulte avant les épisodes de mortalités estivales tandis que plusieurs pathogènes identifiés sévissaient chez des espèces voisines. Citons par exemple, les parasites *Marteilia sydneyi* et *Mikrocytos roughleyi* chez *Saccostrea gigas* (Hine, 1996), *Haplosporidium nelsoni* et *Perkinsus marinus* chez *C. virginica*, (Ford & Haskin, 1987; Oliver *et al.*, 1998), l'Iridovirus chez *C. angulata* ou la maladie des juvéniles la JOD (pour Juvenile Oyster Disease) chez *C. virginica*. La JOD peut se rapprocher des mortalités estivales de *C. gigas* puisqu'elle est provoquée par le concours de facteurs environnementaux et de la bactérie pathogène *Roseovarius crassostrea* (Boettcher *et al.*, 2005; Ford & Borrero, 2001; Maloy *et al.*, 2007)

Chez l'huître creuse, les analyses réalisées dans le cadre de Morest ont montré l'implication de plusieurs pathogènes dans les mortalités estivales. Le virus de l'herpes OsHV-1 est suspecté de provoquer des mortalités aux Etats-Unis en éclosérie (Friedman *et al.*, 2005) et en France (Renault *et al.*, 1995). Lors des analyses de Morest, ce virus avait été détecté chez 40 % des lots d'huîtres

Introduction générale et objectifs

moribondes. Très récemment, il fut observé dans les lots d'individus présentant des mortalités en 2008 et 2009 avec un taux de prévalence de 90 % ou plus.

Les bactéries du genre *Vibrio* sont probablement également impliquées dans l'apparition des mortalités massives de *Crassostrea gigas*. Les analyses microbiologiques réalisées sur les huîtres moribondes lors de cas de mortalités survenus sur l'estran ont montré que dans de nombreux cas, les huîtres étaient alors infectées par des bactéries. Dans 40% des échantillons, une seule espèce de bactérie était isolée, et semblait donc impliquée de façon prioritaire dans le déclenchement du phénomène. Dans la majorité des cas, il s'agit d'espèces du genre *Vibrio*, notamment les bactéries du groupe polyphylétique de *V. splendidus* tels que *V. lentus*, *V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis* mais surtout *V. aestuarianus* qui constituait l'espèce la plus fréquemment identifiée lors de ces travaux. Dans quelques cas des membres de *Pseudoalteromonas sp* ont aussi été retrouvés.

Plusieurs études ont tenté de reproduire les maladies par des infections expérimentales. Les résultats ont montré que la plupart des vibrios sont capables d'induire des mortalités par injection, balnéation ou cohabitation. D'autres études ont permis de mettre en évidence des facteurs de virulence notamment chez l'espèce *V. aestuarianus* (une description plus précise de cette espèce est faite dans la partie bibliographique). Certains mécanismes nouveaux ont été mis en évidence comme des effets synergiques de souches pathogènes proches en co-infection chez *V. splendidus* mais aussi avec *V. splendidus* et *V. aestuarianus* (Sophie de Decker, communication personnelle). Le séquençage complet du génome de *V. splendidus* et de celui de *V. aestuarianus* ouvre la voie à l'étude approfondie des facteurs de virulence et de leur fonctionnement.

Par ailleurs, les environnements marins côtiers qui constituent l'habitat de nombreuses espèces de *Vibrio* présentent des caractéristiques écologiques très diversifiées et variables : la température, la salinité, le pH, l'oxygène, la disponibilité en nutriments ainsi que la lumière montrent tous une forte variabilité dans l'espace et dans le temps. La prévalence et l'abondance des *Vibrio* dans ces environnements sont influencées par ces variations de conditions environnementales (Huq & Colwell, 1996; Tantilillo et al., 2004).

I.2.3. L'environnement et le sédiment

Des observations ont montré des taux de mortalités atteignant 23 % à 33 % en 7 mois de culture pour des huîtres élevées à plat (directement sur le sédiment) contre 8 % à 19 % pour des élevages sur tables (à 70 cm du fond) dans le bassin de Marennes-Oléron (Soletchnik *et al.*, 1999). Cet écart dans les taux de mortalités entre les lots élevés à proximité du sédiment et à 70 cm a été confirmé dans les sites ateliers mis en place à Marennes-Oléron, Baie de Morlaix et baie des Veys

Introduction générale et objectifs

pendant 4 ans. Cette influence du sédiment serait due aux pratiques culturales elles-mêmes qui favorisent l'accumulation de matière organique dans le cas de l'élevage à plat. La dégradation de la matière organique dans les sédiments induirait ainsi une augmentation de la concentration en substances potentiellement toxiques pour les animaux comme l'ammoniaque et les sulfures. L'élevage sur table permettrait ainsi à ces composés de se diluer ou de s'oxyder (sulfures) avant d'arriver au contact avec les individus, ce qui ne serait pas le cas pour l'élevage à plat des huîtres sur le sédiment. Des observations ont d'ailleurs montré une concomitance entre l'apparition des mortalités et l'augmentation de ces substances dans le sédiment. Une remise en suspension du sédiment peut également provoquer le relargage de ces substances vers les eaux sus-jacentes et ainsi représenter une source potentielle de stress pour les huîtres. Le caractère potentiellement toxique du sédiment est confirmé par des bioessais d'embryotoxicité chez l'huître qui montre jusqu'à 98 % d'anomalies larvaires lorsqu'elles sont incubées en présence de certains sédiments. Cette toxicité est corroborée par la baisse des populations de foraminifères observées dans les premiers centimètres du sédiment lors des analyses de Morest et qui sont concomitantes à l'augmentation de ces substances dans le sédiment. Indépendamment des effets indirects induits sur le métabolisme et la physiologie des individus, l'augmentation des températures estivales agit également sur la dynamique des processus biogéochimiques du sédiment. Les composés toxiques issus du sédiment, couplés à d'autres sources de stress (augmentation de la température, baisse de l'oxygène dissous en période de gamétogenèse) pourraient constituer un ensemble de facteurs favorisant des infections.

II. Problématique de l'étude et objectifs

Les mortalités estivales semblent donc être la conséquence de plusieurs facteurs qui agissent simultanément et intègrent les caractéristiques physiologiques de l'hôte, le pathogène et l'environnement. La compréhension des processus responsables des mortalités nécessite la prise en compte de ces trois compartiments. Alors que les interactions entre l'hôte et le pathogène et l'hôte et son environnement ont fait l'objet de nombreuses études, peu de travaux ont été consacrés à l'écologie des vibrions pathogènes d'invertébrés marins. Le sédiment est considéré comme un réservoir potentiel pour certaines bactéries et pourrait donc constituer également un réservoir pour certains *Vibrio* pathogènes de l'huître. Dans ce contexte, nous nous proposons d'abord de caractériser les communautés bactériennes du sédiment et de nous intéresser aux paramètres environnementaux régulant leur abondance et leur structure. Nous focaliserons sur les *Vibrio* et plus particulièrement sur *V. aestuarianus*.

Introduction générale et objectifs

D'autre part, les activités bactériennes contrôlent également les processus biogéochimiques du sédiment, et éventuellement la production d'espèces toxiques qui peuvent influencer la survie des huîtres. Selon cette hypothèse, le sédiment aurait donc un double rôle dans les mortalités estivales, en tant que réservoir potentiel de pathogènes et source de composés potentiellement toxiques (voir ci-dessus). Toutefois, le caractère toxique du sédiment pourrait être une conséquence indirecte de l'impact des activités ostréicoles elles-mêmes sur le sédiment. En effet, des travaux déjà anciens se sont intéressés à l'impact que ces activités pouvaient avoir sur le sédiment. Ces études ont montré que l'augmentation des flux benthiques de matière organique induite par l'activité aquacole entraînait une importante accumulation de celle-ci dans les sédiments et des changements dans la diversité des populations de la macrofaune benthique. Ces résultats laissaient supposer également que l'aquaculture pouvait influencer la diversité des peuplements bactériens du sédiments puisque les bactéries sont les premiers acteurs de la décomposition de la matière organique et qu'elles réagissent promptement à une augmentation de sa concentration. Il existait très peu de données dans la littérature concernant l'impact de l'ostréiculture sur la diversité des communautés bactériennes du sédiment, les données publiées concernant surtout les effets à long terme sur l'abondance et le métabolisme bactérien. Nous avons donc proposé d'étudier l'impact direct c'est-à-dire à court terme de la présence des huîtres sur la communauté bactérienne des sédiments.

Les questions qui émanent de ces éléments de contexte au regard des objectifs de cette thèse sont :

- Quelle est la composition de la flore bactérienne des sédiments des sites ostréicoles et quelles sont les relations avec leurs caractéristiques physico-chimiques ?
- Quel est le rôle du sédiment dans la prolifération des pathogènes d'huître tels que *V. aestuarianus* et quels sont les facteurs qui régulent leur abondance ?
- Quel est le lien entre les activités ostréicoles et les paramètres biotiques (diversité bactérienne) et abiotiques (espèces chimiques) du sédiment ?

Pour répondre à ces questions, nous avons choisi d'étudier :

- 1- les caractéristiques physico-chimiques des sédiments de deux environnements dans lesquels évoluent les huîtres en évaluant l'impact de la culture de ces dernières sur ces paramètres et le risque qu'il génère dans les mortalités estivales de *C. gigas*,
- 2- la structure des communautés bactériennes des sédiments de ces deux environnements en considérant l'impact de la présence des huîtres sur celles-ci, les relations entre leur structure et certains paramètres du sédiment,

Introduction générale et objectifs

- 3- l'écologie d'espèces du genre *Vibrio* pathogènes de *C. gigas* avec un accent mis sur *V. aestuarianus* en évaluant le rôle du sédiment en tant que réservoir de pathogènes.

III. Choix méthodologiques

Ce travail s'est donc appuyé sur la caractérisation physico-chimique des sédiments de sites ostréicoles, l'étude de la dynamique du compartiment bactérien du point de vue de sa structure génétique et enfin l'étude de l'écologie de *V. aestuarianus*. Pour cela, nous avons choisi deux sites ostréicoles en Bretagne : les Viviers de Beg ar Vil (aber Benoît) et Fort Espagnol (rivière d'Auray). Les deux sites sont situés en zone estuarienne, en aval de rivières où des activités humaines autres que l'ostréiculture sont pratiquées. Ils ont été choisis parce qu'ils représentent des exemples d'écosystèmes également soumis à une forte influence anthropique mais qui diffèrent sur d'autres points. A la différence de la rivière d'Auray, l'aber Benoît n'avait jamais connu de crises de mortalités estivales jusqu'aux épisodes des deux dernières années qui ont touché presque tous les sites en France. Alors que la température de l'eau dépasse souvent les 20°C pendant la période estivale à la rivière d'Auray, celle de l'eau à l'aber Benoît atteint rarement 19°C (température seuil de déclenchement des mortalités chez l'huître). Les observations visuelles des sédiments de ces deux sites ont montré qu'ils diffèrent par la couleur et la texture. Le sédiment du site de la rivière d'Auray de couleur très noire est homogène tandis que le sédiment de l'aber Benoît est plutôt gris en surface et noir en profondeur. La différence se ressent aussi au niveau de l'odeur sulfureuse plus forte à la rivière d'Auray qu'à l'aber Benoît. Des analyses préliminaires des sédiments avaient montré la présence de l'espèce *V. aestuarianus* sur les deux sites.

La caractérisation physico-chimique passe par l'analyse de la granulométrie, de la porosité et des composés chimiques tels que l'ammonium, les sulfures, le nitrate, la concentration en matière organique, les gradients verticaux des différents composés dissous dans les eaux interstitielles. Elle a permis de calculer leurs flux à l'interface eau-sédiment en vue d'estimer le risque potentiel que certains peuvent constituer pour les animaux, en l'occurrence les huîtres. La caractérisation bactérienne du sédiment nécessite l'analyse de l'abondance, du métabolisme et de la diversité bactérienne.

Pour le dénombrement, nous nous sommes basés sur des méthodes culturales, bien que ces méthodes ne permettent de dénombrer qu'une partie réduite des bactéries totales d'un environnement. Les premiers tests de comptage direct utilisant le DAPI ou l'acridine orange, n'ont pas donné des résultats concluants du fait de l'interférence des particules du sédiment conduisant ainsi à la sous- ou surestimation du nombre réel de bactéries. Pour détecter et quantifier *Vibrio aestuarianus* dans l'environnement la méthode choisie a été celle de l'hybridation sur colonie d'une

Introduction générale et objectifs

sonde nucléique (colony blot). Cette méthode présente l'avantage de pouvoir repiquer les colonies positives et de vérifier ainsi leur affiliation à *V. aestuarianus*.

L'analyse de la communauté bactérienne des sédiments, a été réalisée par l'étude de la diversité de la région variable V3 du gène codant l'ARNr 16S. Les différents fragments ont été séparés par la méthode de la PCR-DGGE et les groupes bactériens ont été identifiés après séquençages de différentes bandes.

Le document se structure en trois grandes parties. La première bibliographique, traitant respectivement des bactéries du genre *Vibrio*, des caractéristiques de l'huître creuse *C. gigas* et du sédiment permet d'appréhender les relations bactéries-hôte-environnement. Ensuite la partie expérimentale se compose de trois chapitres traitant successivement les trois objectifs cités ci-dessus. Pour finir la troisième partie réservée pour une discussion générale et les perspectives. En annexe sont présentés les flux des composés inorganiques, le protocole de la PCR-DGGE et la version anglaise de l'article 1.



Première Partie

1

Données Bibliographiques

Les bactéries du genre *Vibrio*

I Caractéristiques biologiques

I-1 Généralités

Les bactéries du genre *Vibrio* sont des bacilles gram-négatif, de formes souvent incurvées ou droites, mobiles pour la plupart dans des milieux liquides grâce à un ou plusieurs flagelles polaires. Elles peuvent présenter de nombreux flagelles latéraux après culture sur milieu gélosé. Néanmoins certaines espèces sont dépourvues de flagelles et ne sont pas mobiles. Ce sont des bactéries mésophiles, chimio-organotrophes et anaérobies facultatives qui sont capables de pousser sur des milieux gélosés adaptés pour des bactéries marines tels que le milieu « Marine agar ». Il existe néanmoins des milieux sélectifs comme le milieu de TCBS (Thiosulfate-Citrate-Bile Salt-sucrose agar) qui a été à l'origine synthétisé pour *Vibrio cholerae*, mais reste adapté à la culture de beaucoup d'autres espèces de *Vibrio*. Sur ce milieu, les souches qui utilisent le saccharose forment des colonies jaunes alors que les autres sont de couleurs vertes. Un autre milieu beaucoup moins sélectif, le CHROMagar pour *Vibrio* laisse pousser plus de *Vibrio* et la gamme de couleurs est beaucoup plus diversifiée. Les températures optimales de croissance des *Vibrio* se situent entre 15°C et 30°C.

I-2 Taxonomie

Les bactéries du genre *Vibrio* font partie de la famille des *Vibrionaceae*, de la classe des γ -proteobactéries (Figure 1).

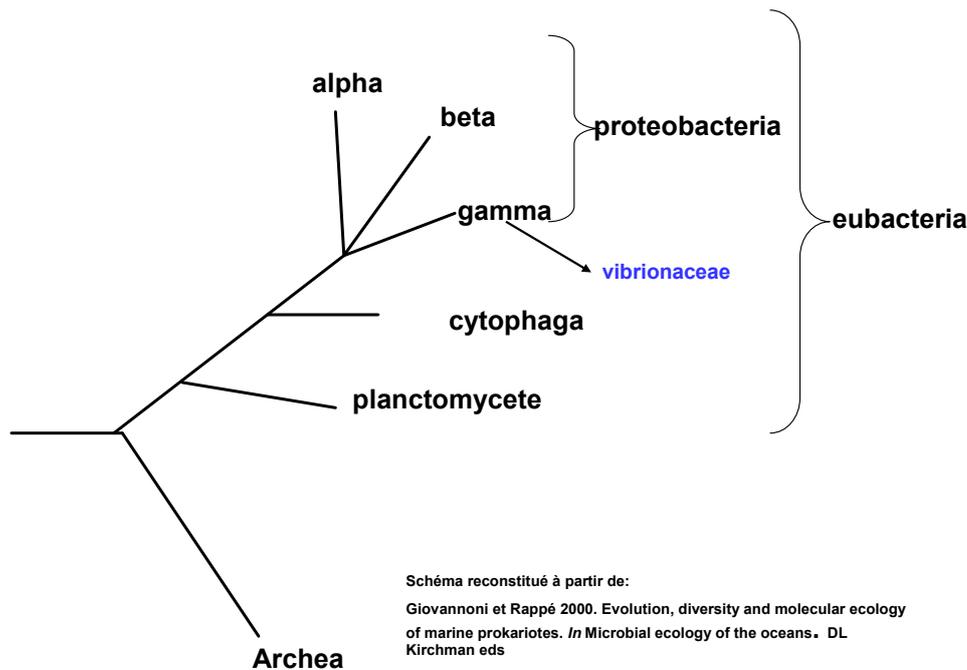


Figure 1 Arbre phylogénique simplifié montrant le genre *Vibrio* par rapport à d'autres groupes (adapté de (Giovannoni & Rappé, 2000))

Les *Vibrio* ont été l'un des premiers groupes bactériens à avoir été étudié. Dès 1854, Filippo Pacini a étudié *Vibrio cholerae* l'agent étiologique du cholera, puis en 1883 le docteur Robert Koch prend la relève avec une étude plus poussée de cette bactérie. C'est à cette époque qu'elle a été impliquée dans la maladie. Depuis le nombre d'espèces de ce genre n'a cessé de croître. Au 29 juillet de l'année 2009 le genre *Vibrio* compte 91 espèces bien identifiées (<http://www.bacterio.cict.fr/uw/vibrio.html>). Au départ la classification des *Vibrio* était basée comme pour les autres bactéries sur des traits morphologiques (coloration Gram, mobilité, présence de flagelle ou non, forme sur milieu gélosé) et des caractéristiques physiologiques en rapport avec la présence et la nature de certaines enzymes et le catabolisme des sucres (Lysine, ornithine décarboxylase, la production de l'indole, arginine dihydrolase, oxydase, chitinase, gélatinase, ...).

D'autres critères écologiques tels que la susceptibilité à l'agent vibriostatique O/139, la tolérance au sel, les températures de croissance, le pH et la pression osmotique sont aussi pris en compte. Dès 1957, Sneath applique la taxonomie numérique aux bactéries (Sneath, 1957). De manière schématique, la méthode consiste à étudier, pour chaque souche, plus d'une centaine de caractères morphologiques, biochimiques ou culturels, ainsi qu'à attribuer le même poids à chacun des caractères qui sont codés 1 (présence du caractère) ou 0 (absence du caractère). Le but recherché

Données bibliographiques : les bactéries du genre *Vibrio*

est de rassembler dans une classe de similitude les individus les plus semblables. La composition en GC % (Guanine Cytosine) du génome rentre en compte à partir de 1994 (Alsina & Blanch, 1994). Même en multipliant le nombre de caractères étudiés (jusqu'à 300 dans certaines études), la taxonomie numérique n'évalue que 5 à 20 % du potentiel génétique d'une bactérie.

La taxonomie actuelle des espèces du genre *Vibrio* est basée sur une approche dite « polyphasique » qui fait référence à une classification tenant compte d'un maximum de données, données génétiques (pour l'appartenance de deux souches à la même espèce au moins 70 % de similarité lors d'hybridation ADN-ADN, plus de 98 % d'homologie des séquences d'ARNr 16S), données morphologiques, données biochimiques, données écologiques (niche écologique proche). Ainsi la comparaison des séquences des gènes *recA*, *rpoA* et l'ADNr 16S a été utilisée en complément de l'hybridation ADN-ADN et des caractères phénotypiques pour reconsidérer la phylogénie des *Vibrio* par (Thompson *et al.*, 2004a) (Figure 2)

Données bibliographiques : les bactéries du genre *Vibrio*

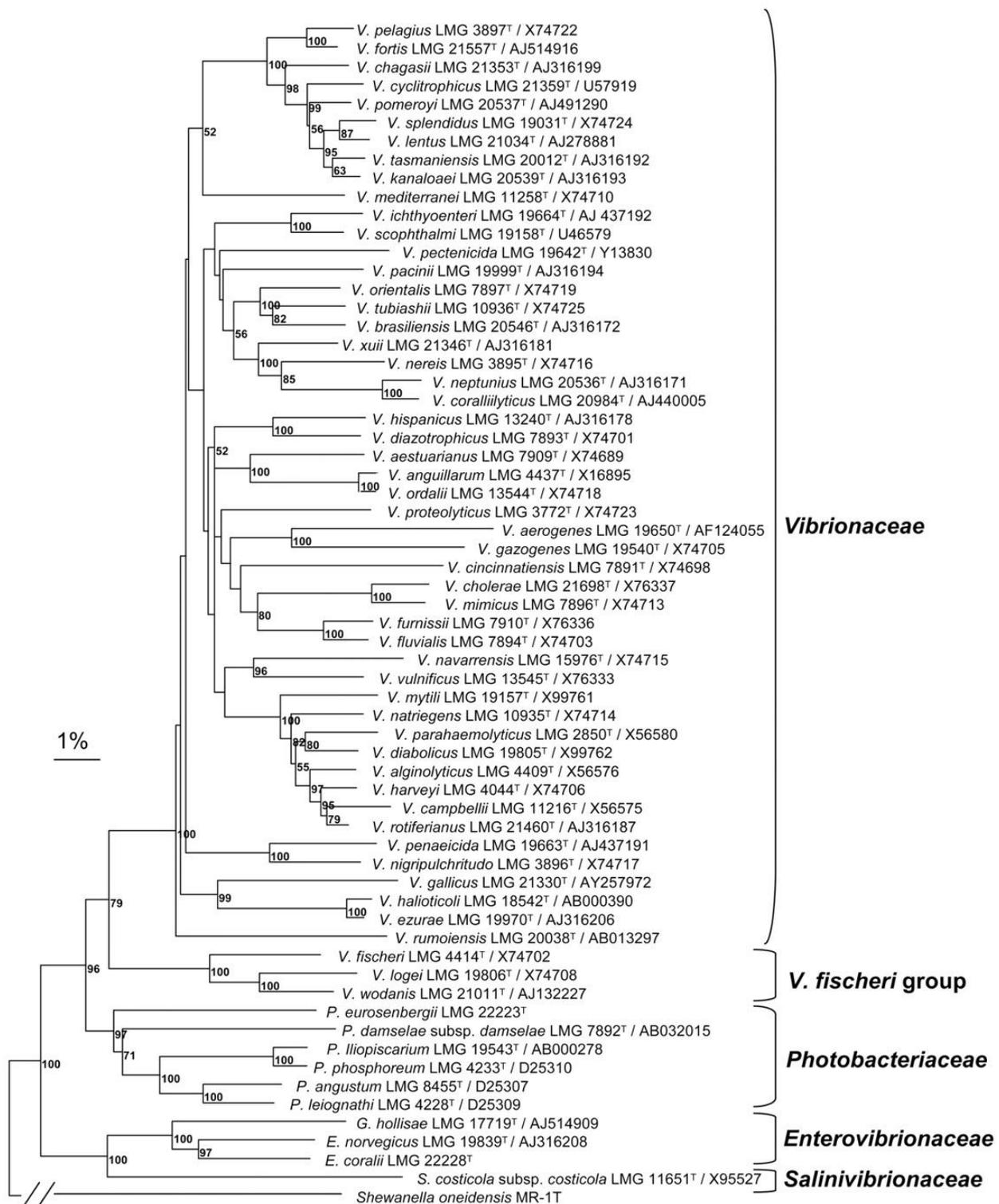


Figure 2 : Arbre phylogénétique des *Vibrio* basé sur les séquences concaténées des gènes *rpoA*, *recA* et l'ADNr 16S (Thompson, Iida et al. 2004)

I-3 Le génome des *Vibrio*

Uniquement 6 espèces de *Vibrio* dont le génome est séquencé sont actuellement accessibles, parmi lesquels deux espèces non pathogènes de l'homme comme *V. splendidus* (Le Roux *et al.*, 2009) et *V. fischeri* (Ruby *et al.*, 2005) (Tableau 1) et 34 autres génomes sont en cours de séquençages (<http://www.genomesonline.org/index.htm>). La particularité de ces génomes réside dans leurs deux chromosomes circulaires (un grand et un petit) contrairement aux autres bactéries. En général, le grand chromosome, Chr1, héberge les gènes dits de ménage (house keeping genes) comme la machinerie de réplication de l'ADN ou les protéines ribosomales. Pour (Heidelberg *et al.*, 2000), le petit chromosome Chr2 serait un méga plasmide qu'aurait acquis une espèce ancestrale des vibrions. Ce plasmide aurait lui-même acquis des gènes essentiels à son maintien dans la cellule mais pas les gènes nécessaires à son intégration dans le chromosome Chr1. Ce plasmide contient des gènes accessoires tels que les gènes de résistance aux antibiotiques, les gènes nécessaires à la survie dans l'environnement ou encore les gènes de pathogénicité. Cependant, chez *V. parahaemolyticus*, la plupart des gènes de ménage sont localisés sur le gros chromosome (Makino *et al.*, 2003). Ce chromosome est plus diversifié et contient des gènes spécifiques à l'espèce. Par exemple, chez *V. cholerae*, il existe un îlot d'intégrons de 125 Kb contenant 216 phases ouvertes de lecture et qui codent pour des intégrases, des protéines antimicrobiennes, des facteurs de virulence et des gènes nécessaires à la survie dans l'environnement comme les gènes de chimiotactisme (Heidelberg *et al.*, 2000). Chez *V. parahaemolyticus*, le chromosome Chr2 semble jouer un plus grand rôle dans l'adaptabilité de cette espèce à l'environnement. En effet, on y trouve des gènes liés au transport et au métabolisme des hydrocarbures et des ions inorganiques, la biosynthèse des métabolites secondaires. Le chromosome Chr2 de *V. vulnificus* est organisé de la même manière que celui de *V. parahaemolyticus*.

Néanmoins plusieurs gènes nécessaires pour la survie dans l'environnement tels que les gènes qui codent pour le métabolisme de la chitine, le quorum sensing sont scindés entre les deux types de chromosomes. Par exemple, le phage CTX de la toxine du choléra et les gènes de RTXs (Repeat-intoxins) sont sur le chromosome Chr1 alors que des hémolysines et lipases additionnelles sont portées par les Chr2. Le gène *MSHA* qui est connu pour son importance dans la formation des biofilms et dans le fitness environnemental est localisé sur le chromosome Chr1. Grimes *et al.*, ont montré que les 8 souches nommées dans le tableau 1, possèdent des gènes nécessaires à la réduction des nitrates et du triméthyl-N-oxide ce qui leur procure des accepteurs d'électron et présente un avantage dans

Données bibliographiques : les bactéries du genre *Vibrio*

des environnements très anoxiques comme les sédiments marins riches en matière organique (Grimes *et al.*, 2009)

Données bibliographiques : les bactéries du genre *Vibrio*

Tableau 1 : Présentation des caractéristiques moléculaires de quelques espèces de *Vibrio* adaptée de Grimes *et al.*, (2009)

Feature	<i>V. cholerae</i> El Tor N16961	<i>V. cholerae</i> O395	<i>V. fischeri</i> ES114	<i>V. harveyi</i> BAA-1116	<i>V. parahaemolyticus</i> RIMD 2210633	<i>V. splendidus</i> LGP32	<i>V. vulnificus</i> CMCP6	<i>V. vulnificus</i> YJO16
Chr1 (Mb)	3	3	2.9	3.8	3.3	3.3	3.3	3.4
Chr2 (Mb)	1.1	1.1	1.3	2.2	1.9	1.7	1.8	1.9
ORFs (Chr 1+2)	3,885	3,875	3,802	5,944	4,832	4,498	4,489	4,959
GC content of Chr1/Chr2	47.7/46.9	46.9/47.8	39.0/37.0	45.5/45.3	45.4/45.4	44.0/43.6	46.4/47.1	46.4/47.2
RNAs in Chr1/Chr2	119/4	118/4	150/15	143/24	143/17	140/28	123/16	128/15
Major pathogenicity factors	CTX, RTX, TCP, T2SS	CTX	CTX, RTX, TCP, TCT	n.r.	tdh, T3SS1, T3SS2	Hemolysins, antibiotic resistance, siderophores, T2SS, T4SS	n.r.	Capsule, siderophores, hemolysins, heme receptor, RTX
Selected Environmental survival factors	Chitinase, MSHA	Chitinase	Chitinase	Chitinase	Polar and lateral flagella, chitinase	Transformation competence, siderophores, chitinase	Siderophores, chitinase	Siderophores, chitinase
Plasmids (Kb)	n.r.	n.r.	pES100 (45.8)	pVIBHAR (89.0)	n.r.	n.r.	n.r.	pYJO16 (48.5)
Reference	(Heidelberg <i>et al.</i> , 2000)		(Ruby <i>et al.</i> , 2005)		(Makino <i>et al.</i> , 2003)	(Le Roux <i>et al.</i> , 2009)	(Kim <i>et al.</i> , 2003)	(Chen <i>et al.</i> , 2003)

II Ecologie du genre *Vibrio*

Dans ce paragraphe, nous allons tout d'abord aborder la question de l'écologie du genre *Vibrio* à travers les facteurs qui régulent ses populations. Nous présenterons ensuite quelques stratégies développées par les différentes espèces du genre afin de s'adapter à leur environnement.

II-1 Généralités sur l'écologie du genre *Vibrio*

La famille des *Vibrionaceae* est un groupe de bactéries très diversifié. Ce groupe contient aussi bien des bactéries libres, symbiotiques que des pathogènes. Diverses études se sont intéressées dès les années 60 à l'écologie des *Vibrio*. La plupart de celles-ci ont concerné les espèces pathogènes de l'homme comme *V. cholerae*. Néanmoins, on trouve quelques études focalisées sur la distribution du genre *Vibrio* sans cibler particulièrement une espèce. Les espèces du genre *Vibrio* sont des bactéries hétérotrophes faisant partie des espèces les plus abondantes parmi les bactéries cultivées des environnements marins tels que les eaux côtières, les estuaires, le sédiment, les infrastructures aquacoles. Ils sont souvent observés en association avec des organismes marins comme les coraux, les poissons, les mollusques, les algues, les crevettes et le zooplancton (Thompson, Iida et al. 2004). Les *Vibrio* peuvent également survivre dans l'environnement en formant des biofilms ou en entrant dans un état viable mais non cultivable (VBNC). Ecologiquement, les *Vibrio* jouent un rôle très important dans la dégradation de la matière organique. Cette activité de minéralisation permet le transfert du carbone organique dissout vers les maillons les plus élevés de la chaîne trophique. D'autres *Vibrio* jouent un rôle dans la dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les sédiments pollués (Grossart *et al.*, 2005).

Les environnements marins côtiers qui constituent l'habitat de nombreuses espèces de *Vibrio* présentent des caractéristiques écologiques très diversifiées et variables : la température, la salinité, le pH, l'oxygène, la disponibilité en nutriments ainsi que la lumière montrent tous une forte variabilité dans l'espace et dans le temps. La prévalence et l'abondance des *Vibrio* dans ces environnements sont influencées par les variations saisonnières de ces facteurs (Huq & Colwell, 1996; Tantillo et al., 2004).

Ainsi, la température et la salinité sont les principaux facteurs intervenant dans la distribution et la variation des populations totales de *Vibrio* (Motes *et al.*, 1998; Thompson *et al.*, 2004b; Wright *et al.*, 1996). L'effet de la température varie en fonction des zones d'étude mais reste prédominant et les plus fortes concentrations de *Vibrio* sont enregistrées lorsque la température de l'eau est comprise

entre 20°C et 30°C (Tantillo *et al.*, 2004). Les effets de la salinité varient selon les études et l'environnement étudié. En effet selon l'environnement, des études ont rapporté des corrélations positives, négatives ou inexistantes entre la salinité et l'abondance des espèces de *Vibrio* (Kaspar & Tamplin, 1993; Tantillo *et al.*, 2004).

D'autres facteurs peuvent intervenir, à savoir la quantité de matière organique, les algues, le zooplancton, les concentrations d'ammonium et de phosphore (Lipp *et al.*, 2001; Louis *et al.*, 2003). Il faut remarquer ici que les analyses utilisées lors de ces études s'appuyaient sur des méthodes culturales utilisant des milieux sélectifs comme le TCBS (Diggle *et al.*, 2000), et ne considéraient donc que la part cultivable des *Vibrio*. Des méthodes d'analyses moléculaires mises en œuvre dans de récentes études ont confirmé l'importance de la température et de la salinité mais aussi du phosphore dans l'abondance des *Vibrio* dans les eaux des mers Baltique et Skagerrak (Eiler & Bertilsson, 2006). La biomasse planctonique semble également constituer un facteur impliqué dans la régulation de la densité des *Vibrio*. Il a en effet été démontré que plusieurs espèces de vibrions survivent dans l'environnement grâce à leur capacité à s'attacher à diverses variétés de substrats tels que les algues et l'exosquelette d'organismes zooplanctoniques de l'eau de mer et du sédiment (Barbieri *et al.*, 1999; Jores *et al.*, 2003; Montanari *et al.*, 1999). Pour certains auteurs, l'évolution des populations de *Vibrio* peut également être induite par des changements brutaux des conditions environnementales (Lipp *et al.*, 2001; Louis *et al.*, 2003; Randa *et al.*, 2004). Par exemple, dans les semaines qui ont suivi l'ouragan Katrina en août 2005 en Louisiane et la Nouvelle Orléans (Etats-Unis), il y a eu des risques de maladies liées aux inondations qui se sont traduites par 22 cas de contaminations par des espèces de *Vibrio* qui ont fait 5 morts.

II-2 Stratégies de prolifération et d'adaptation dans l'environnement

Les bactéries du genre *Vibrio*, ont su développer différentes stratégies afin de s'adapter aux changements brusques des conditions de l'environnement grâce à des mécanismes tels que le Quorum-Sensing, leur capacité à se fixer aux exosquelettes des copépodes, la formation de biofilm sur des surfaces inertes ainsi que leur aptitude à entrer dans un état viable mais non cultivable.

II-2-1 Le Quorum-Sensing

Le Quorum Sensing (QS) est un phénomène de régulation de l'expression d'un gène en réponse à des modifications dans la densité de populations cellulaires chez les bactéries. Il s'agit d'une forme de communication inter-cellulaire au sein des communautés bactériennes qui leur

permet de produire des stratégies adaptées à un environnement donné. Le phénomène a été découvert pour la première fois chez *V. fischeri* qui utilise ce système pour produire de la bioluminescence lorsqu'elle colonise les organes des poissons ou du calamar. Les bactéries possédant le QS produisent et relâchent dans l'environnement des molécules chimiques, les « autoinducers » dont les concentrations augmentent en fonction de la densité de population cellulaire. Les bactéries gram positif et les bactéries gram négatif utilisent le QS pour réguler diverses activités physiologiques. En général, les gram négatif utilisent une molécule, le N-acétyl-homosérine-lactone (AHL) et les gram positif des oligo-peptides comme autoinducers. L'AHL est le produit d'un des gènes lux (*luxI*) qui code l'acyl homoserine lactone synthase, LuxI (Hanzelka *et al.*, 1999; Schaefer *et al.*, 1996). L'AHL est produit par chaque cellule à un niveau basal dans le milieu. Sa concentration augmente donc lorsque la densité des cellules s'accroît. Une fois qu'une concentration seuil de cette molécule est atteinte, la molécule est fixée par le peptide LuxR (codé par le gène *luxR*) qui ensuite régule l'expression de l'opéron lux (Figure 3). Les processus régulés par QS sont le plus souvent la symbiose, la virulence, la conjugaison, la production d'antibiotiques, la mobilité, la sporulation et la formation de biofilms pour ne citer que ceux là.

Depuis *V. fischeri*, le QS a été identifié chez d'autres bactéries y compris des bactéries du genre *Vibrio*. Les composants sont presque similaires mais les mécanismes varient en complexité. Tous les *Vibrio* analysés possèdent des systèmes qui font intervenir l'activateur LuxO mais les voies de transmission des signaux jusqu'à LuxO varient selon les espèces. Chez *V. vulnificus* un seul circuit conduit à l'activation de LuxO et régule surtout les gènes de virulence (Kim *et al.*, 2003; Shao & Hor, 2001). Il existe en revanche trois circuits chez *V. cholerae* et *V. harveyi* dont deux sont homologues. Les trois systèmes permettent de réguler la bioluminescence, l'expression de la métalloprotéase, la production d'exopolysaccharides et de sidérophores chez *V. harveyi* (Bassler *et al.*, 1993; Bassler *et al.*, 1994; Henke & Bassler, 2004; Lilley & Bassler, 2000; Mok *et al.*, 2003). Chez *V. cholerae*, le système fonctionne de telle sorte qu'il régule la formation de biofilms nécessaires à la survie de la bactérie dans des environnements hostiles et l'expression des gènes de virulence (Zhu & Mekalanos, 2003). *V. anguillarum* possède deux systèmes identifiés et un troisième présumé qui conduisent à l'activation de LuxO. Ce système de régulation pourrait être encore plus complexe, et l'existence d'un quatrième système a été supposée (Henke & Bassler, 2004). Ces signaux spécifiques utilisent la protéine phosphotransférase LuxU qui transmet les informations externes à la protéine régulatrice LuxO. Le QS est un moyen de communication qui peut aussi servir dans la survie. Chez *V. fischeri* les systèmes permettent le maintien de la relation de symbiose avec l'hôte. Il peut être aussi un moyen de passer d'un environnement à un autre comme par exemple d'un

Données bibliographiques : Les bactéries du genre *Vibrio*

hôte eucaryote à l'environnement estuarien. Ainsi, la bactérie peut choisir d'être libre ou fixée dans un biofilm. Les bactéries peuvent ainsi contrôler leurs activités, leur environnement et leur évolution.

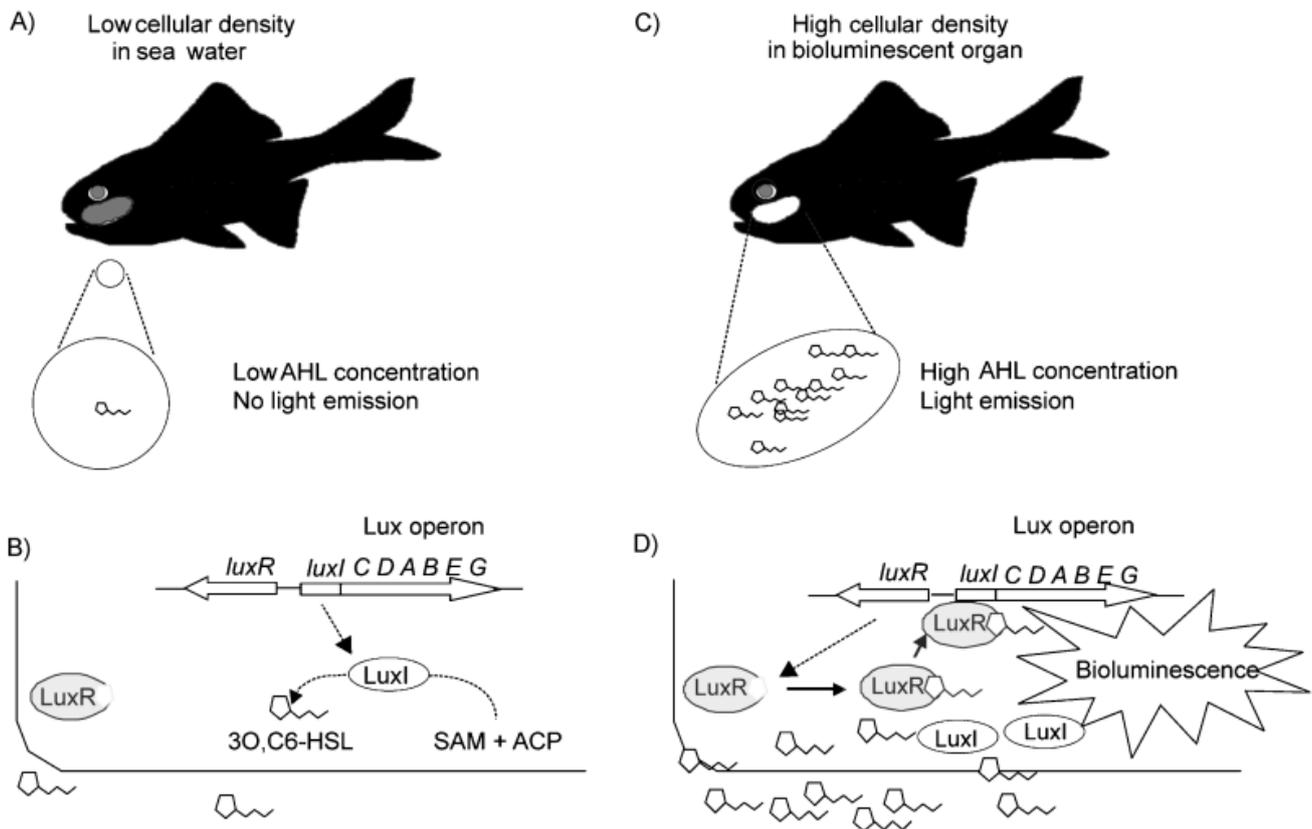


Figure 3: Schéma de la régulation du QS chez *Vibrio fischeri*. A) et C) vue schématique de la relation poisson-*Vibrio*. B) et D) régulation simplifiée du gène de bioluminescence chez les *Vibrio* à B) faible densité cellulaire et D) forte densité cellulaire (Uroz *et al.*, 2009).

II-2-2 L'état viable mais non cultivable ou VBNC (Viable But Non Cultivable)

L'état VBNC fait référence à un état physiologique dans lequel une cellule bactérienne ne peut pas être cultivée via les milieux de culture conventionnels, alors qu'elle reste métaboliquement active et que son état est réversible. Pour certains auteurs, cet état ne constitue néanmoins qu'une étape transitoire vers la mort (Joux *et al.*, 1997).

Pour d'autres auteurs, l'état VBNC est une réponse de survie des bactéries exposées à des conditions de stress environnementaux tels qu'une température très basse, la salinité, l'aération, la disponibilité en nutriments ou de la lumière (Barer & Harwood, 1999; Gourmelon *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1982). Dans ces conditions, les bactéries peuvent revenir à l'état normal lorsque les conditions

Données bibliographiques : Les bactéries du genre *Vibrio*

seront à nouveau favorables (Stevenson, 1978). Des études ont montré que l'augmentation de la température ou de nutriments permet le retour à l'état normal des cellules bactériennes (Oliver *et al.*, 1995; Ramaiah *et al.*, 2002; Whitesides & Oliver, 1997) au bout d'un temps variable selon les espèces. Pour certaines espèces, l'augmentation de la température ne permet pas toujours le retour vers l'état normal et doit être combinée à d'autres facteurs (Bogosian *et al.*, 1998).

Plus d'une vingtaine d'espèces du genre *Vibrio* possèdent cette capacité à entrer dans un état VBNC (Amel *et al.*, 2008; Chiang & Chou, 2009; Colwell *et al.*, 1985; Ramaiah *et al.*, 2002; Randa *et al.*, 2004). Le passage à l'état de VBNC s'accompagne de certaines modifications morphologiques. Par exemple la taille des cellules VBNC de *V. cholerae* O1 et O139 diminue au fur et à mesure du processus et elles prennent une forme coccoïdale. De même le volume du cytoplasme baisse, générant un grand espace entre la membrane de la cellule et la paroi (Chaiyanan *et al.*, 2007). Ces changements de forme et d'aspect ont été rapportés chez *V. cincinnatiensis*, pathogène de l'humain mais aussi du crabe (Figure 4) (Zhong *et al.*, 2009).

Plusieurs espèces bactériennes gardent leur caractère pathogène et demeurent virulentes pendant la période de dormance ou VBNC (Oliver & Bockian, 1995; Pruzzo *et al.*, 2003; Zhong *et al.*, 2009). Pour McDougald *et al.*, (1998) l'état VBNC constitue une partie intégrante du cycle de vie des bactéries pathogènes. Le fait que certains pathogènes puissent persister dans l'environnement et continuent d'exprimer les gènes de virulence reste un problème de santé publique. Diverses méthodes cependant permettent de détecter et de quantifier des cellules VBNC et ainsi de pallier les défauts liés aux méthodes par culture (Figure 5)

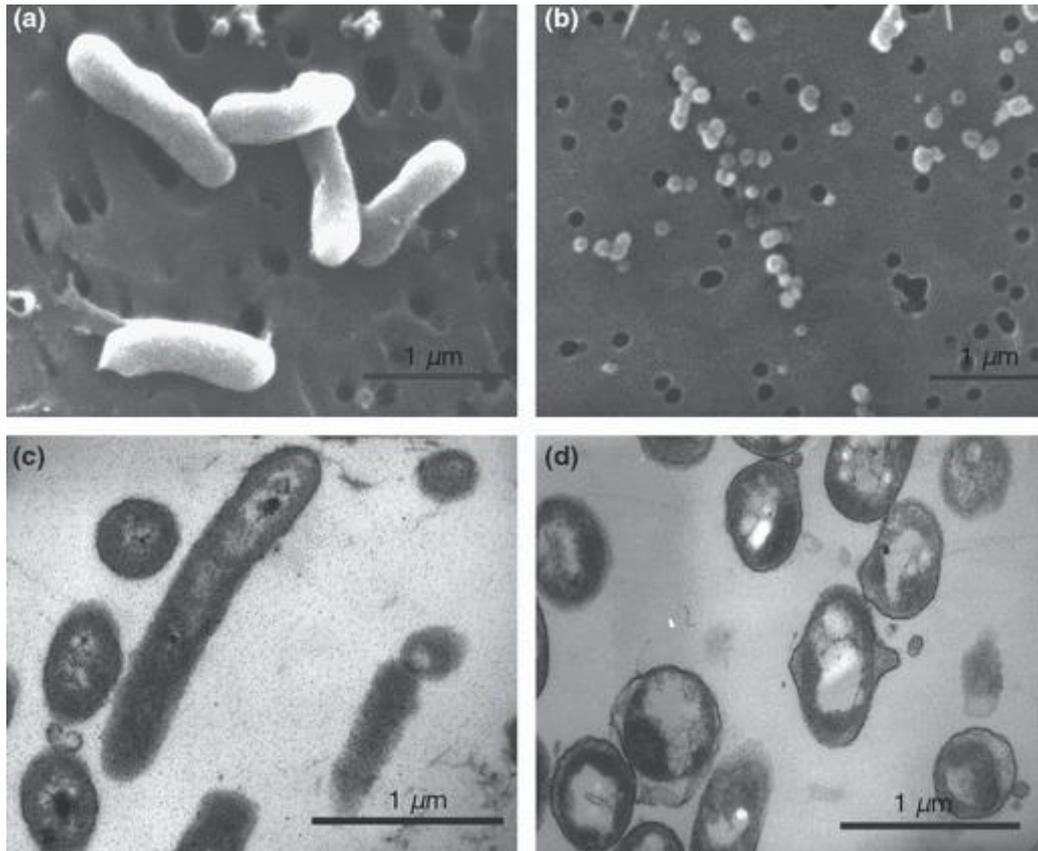


Figure 4: Photos d'électromicroscopie à balayage de cellules de *V. cincinnatiensis* VIB 287. (a) : les cellules normales ; (b) : les cellules VBNC ; (c) et (d) : electromicroscopie à transmission des cellules normales et des cellules VBNC respectivement. (Zhong *et al.*, 2009).



Figure 5 Diagramme schématisant un ensemble des approches permettant d'évaluer la viabilité bactérienne (Keer & Birch, 2003). Une cellule vivante présente une intégrité et une perméabilité membranaires comparées à la cellule morte. Pour différencier les cellules mortes des vivantes, on peut recourir à la cytométrie en flux ou les méthodes fluorimétriques qui reposent sur la détection de l'intégrité cellulaire ou membranaire (Caron & Badley, 1995; Diaper & Edwards, 1994; Turner *et al.*, 2000). D'autres exploitent la réponse physiologique ou l'activité métabolique comme la respiration ou la synthèse des ARNm (Kogure *et al.*, 1979; McCarty & Atlas, 1993). Ainsi, la méthode DVC (pour Direct Viable Count) consiste à fournir des éléments nutritifs dans un milieu pour amorcer la croissance cellulaire. Ensuite, on ajoute un antibiotique qui bloque la division cellulaire. Les cellules actives qui ne se divisent plus sont alors plus grosses que les cellules inactives. Les marqueurs moléculaires comme l'ADN, l'ARNm ou l'ARNr sont utilisés comme indicateurs de la viabilité. Des méthodes moléculaires telles que la PCR, la RT-PCR, l'hybridation in situ (FISH) permettent de détecter et de quantifier ces molécules dans un milieu donné. Néanmoins l'ARNm s'est avéré plus fiable que les deux autres. L'ARNr a une durée de vie plus grande (Tolker-Nielsen *et al.*, 1998) et l'ADN peut persister dans le milieu sur une longue période après la mort de la cellule (Deere *et al.*, 1996; Hellyer *et al.*, 1999).

Données bibliographiques : Les bactéries du genre *Vibrio*

Le biofilm est décrit comme un processus au cours duquel une population de cellules bactériennes passe d'une vie planctonique vers un stade de microcolonie et pour finir au stade de biofilm dans lequel les cellules sont enrobées dans une matrice d'exopolysaccharides (Costerton, 1995; O'Toole *et al.*, 2000; Palmer & White, 1997). Le biofilm possède un mode d'organisation particulier dans l'espace et sa formation se déroule en plusieurs étapes (Figure 6). Lors de la première étape, l'attachement ou association fait intervenir des phénomènes de chimiotactisme de la cellule planctonique vers une surface. Chez *V. cholerae*, on dénombre environ 68 ORFs putatifs de chimiotactisme (Heidelberg *et al.*, 2000). Les cellules planctoniques, comme c'est le cas chez les bactéries du genre *Vibrio*, sont caractérisées par la présence de flagelles, organes de mobilité. Les gènes de synthèse des flagelles sont très activement exprimés au stade planctonique. Dans l'étape suivante, l'adhésion, la synthèse des flagelles est réprimée tandis que les protéines d'adhésion sont surexprimées. Des études ont montré l'intervention de différents gènes tels que le *msha* (mannose-sensitive haemagglutinine), le *tcp* (toxin-coregulated pilus), le *ha* (haemagglutinine) dans l'association des *Vibrio* à des surfaces (Chiavelli *et al.*, 2001; Marsh *et al.*, 1996; Meibom *et al.*, 2004; Reguera & Kolter, 2005). Cette étape d'adhésion nécessite en outre la présence de surfaces adéquates c'est-à-dire, des surfaces présentant des éléments nutritifs nécessaires pour les cellules. Ainsi, les surfaces souvent colonisées sont riches en polymères dont la dégradation conduit à l'enrichissement du milieu en polysaccharides permettant ainsi la multiplication des cellules et la formation de microcolonies. La formation de microcolonies est modulée par le Quorum-Sensing (Hammer & Bassler, 2003) et la synthèse d'exopolysaccharides (EPS) (Kiersek & Watnick, 2003; Moorthy & Watnick, 2004). La synthèse des EPS est essentielle car elle permet de renforcer l'interaction entre les bactéries et par conséquent module la différenciation des microcolonies en biofilms et leur permet ainsi de résister à la prédation ou aux attaques d'autres bactéries (Matz & Kjelleberg, 2005; Matz *et al.*, 2005).

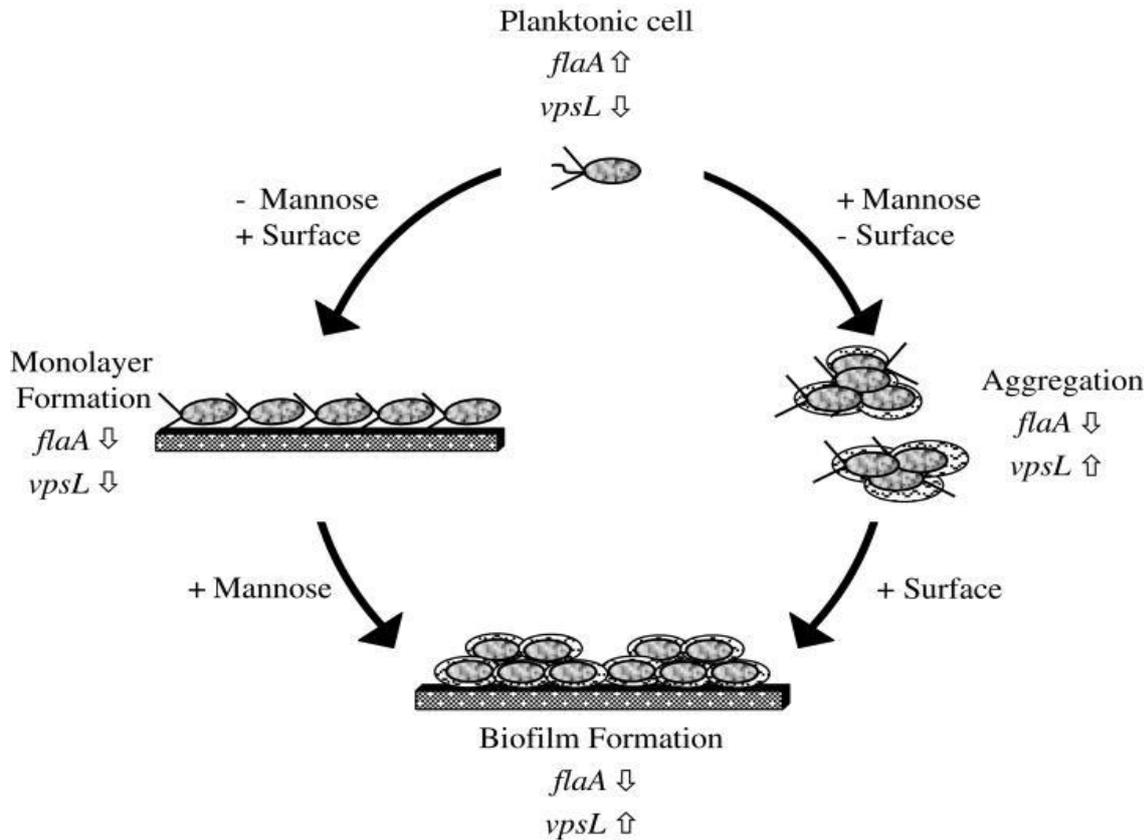
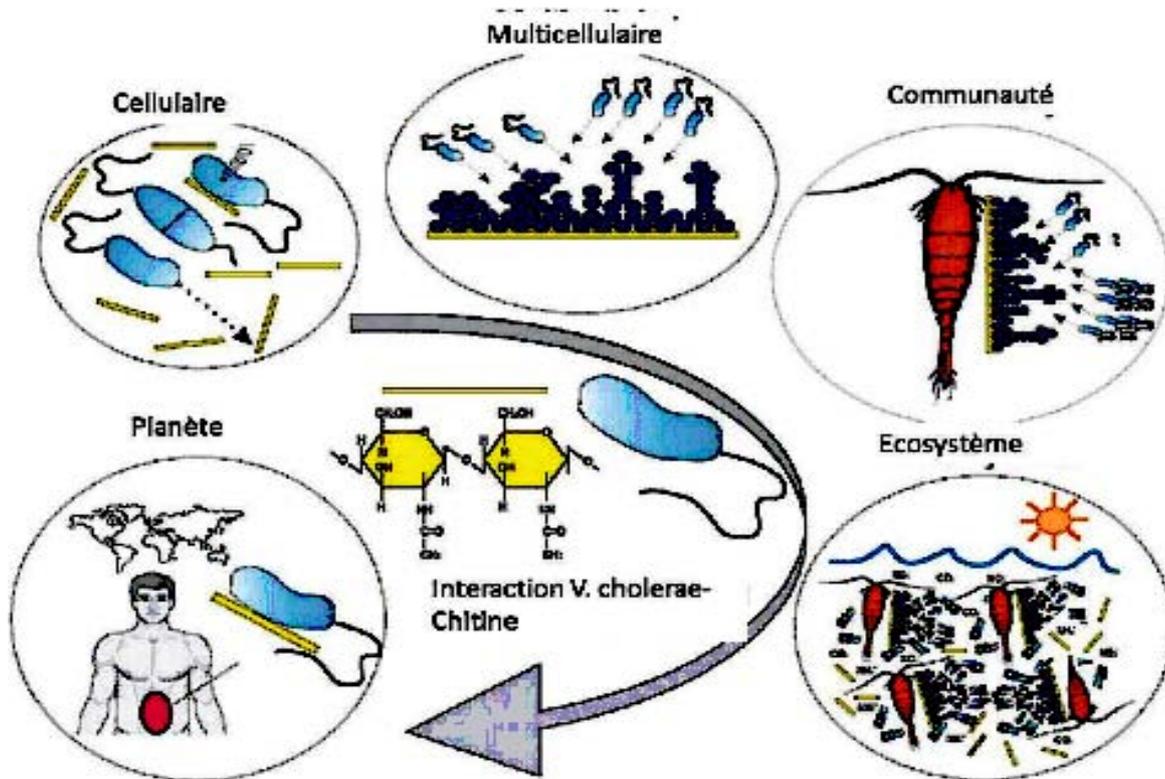


Figure 6 : Schéma d'un model de du processus de formation d'un biofilm dans l'environnement. Sous l'action de la MSHA, les cellules planctoniques s'agrègent en monocouche à la rencontre d'une surface. Dès lors, elles perdent leurs flagelles et la dégradation des nutriments présents sur la surface génère un signal pour la progression du biofilm.

II-4 Rôle de la chitine

La capacité à se fixer à des surfaces est courante chez les bactéries du genre *Vibrio*. Dans le milieu aquatique, diverses surfaces sont disponibles telles que les particules minérales en suspension, les surfaces des plantes riches en cellulose, les exosquelettes des crustacés principalement composés de chitine, un composé polysaccharide (Watnick *et al.*, 1999). Vezzulli *et al.*, (2008) ont montré la capacité de différentes espèces telles que *V. parahaemolyticus*, *V. nereis*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. splendidus*, *V. metschnikovii* à s'attacher à la chitine et à l'utiliser comme source de carbone et d'azote. L'analyse du génome de différents *Vibrio* a montré que le gène de la chitinase était très répandu chez les *Vibrionacea* (Hunt *et al.*, 2008). Le CBPs (Chitin binding protein) est une protéine qui permet la fixation à la chitine et qui est retrouvée chez plusieurs espèces de *Vibrio* (Kirn *et al.*, 2005; Montgomery & Kirchman, 1993; Pruzzo *et al.*, 1996; Vezzulli *et al.*, 2008). Ce mécanisme joue un rôle très important dans la régulation du cycle de vie de ces espèces, en



déterminant notamment l'attachement ou le choix du substrat, et donc le passage d'un biotope à l'autre (Colwell, 2002). Ainsi, *V. cholerae* et d'autres espèces de *Vibrio* pathogènes utilisent la chitine ou la cellulose du zooplancton et du phytoplancton en attendant les meilleures conditions pour retourner dans leur hôte eucaryote. *V. cholerae* se multiplie plus rapidement sur les surfaces chitineuses des crabes et des crevettes. Tamplin *et al.*, (1990) ont montré que l'attachement à des surfaces chitineuses est partie intégrante du cycle de vie de *V. cholerae*. Certains auteurs rapportent également une détection par PCR de *V. cholerae* négative dans l'eau de mer mais positive pour les copépodes, quoique dans tous les cas la bactérie s'avère alors non-cultivable. Ces résultats suggèrent donc que les copépodes servent de réservoirs aux cellules de VBNC de *V. cholerae* (Chaiyanan *et al.*, 2001; Tamplin *et al.*, 1990).

La cellule fixée à la chitine est également capable d'utiliser cette dernière comme source de carbone et d'azote et participe par là à la minéralisation de ce composé (Gooday, 1991). Or, la chitine est un des polymères les plus abondants dans le milieu marin (Gooday, 1990) après la lignine et la cellulose. Sachant qu'environ 10^9 tonnes de chitine sont produites par an par les copépodes (Keyhani & Roseman, 1999), la minéralisation de la chitine par les *Vibrio* pourrait contribuer pour une part non-négligeable aux cycles du carbone et de l'azote dans l'environnement (Figure 7).

Figure 7 : Impact de l'interaction *V. cholerae*–chitine à différentes échelles dans l'environnement : la réponse cellulaire (multiplication cellulaire, chimiotactisme, compétence), la formation de biofilm, l'association aux organismes possédant la chitine, le cycle du carbone et de l'azote et la pathogénie envers l'humain.

III Interaction *Vibrio*–Environnement–Hôte

Dans cette partie, nous allons décrire les différents types de relations écologiques que les *Vibrio* peuvent entretenir avec leur(s) hôte(s). La niche écologique des *Vibrio* est en effet très diversifiée et l'on retrouve des espèces symbiotiques, commensales mais aussi pathogènes d'organismes aquatiques et de l'humain.

III-1 La symbiose

Dans la nature plusieurs espèces de poissons et de calmars établissent une relation mutualiste appelée symbiose bioluminescente (Herring & Locket, 1978) faisant intervenir une seule et unique espèce bactérienne lumineuse (Dunlap & Ast, 2005; Reichelt *et al.*, 1977). C'est le cas par exemple de *V. fischeri* (Lupp & Ruby, 2005; Nyholm *et al.*, 2009; Visick & Ruby, 2006; Wollenberg & Ruby, 2009) que l'on retrouve en association symbiotique avec le calmar hawaïen *Euprymna scolopes* (Figure 8). Dans cette relation, l'animal utilise la lumière transmise par la bactérie dans la reproduction, dans la formation de bancs pour éviter les prédateurs et pour attraper des proies (Jones & Nishiguchi, 2004; Woodland *et al.*, 2001). La bactérie de son côté utilise les nutriments fournis par son hôte pour se multiplier et se disséminer (Haygood *et al.*, 1984; Ruby & Asato, 1993). *V. haliotocoli* est une bactérie symbiotique du système digestif des ormeaux (Tanaka *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2003). De par sa capacité à fermenter l'alginate en acide acétique, il intervient dans la digestion chez ces animaux (Hayashi *et al.*, 2003; Sawabe *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2003). Diverses espèces sont attachées à l'exosquelette du zooplancton en formant des biofilms et établissent des relations avec l'hôte et d'autres bactéries.

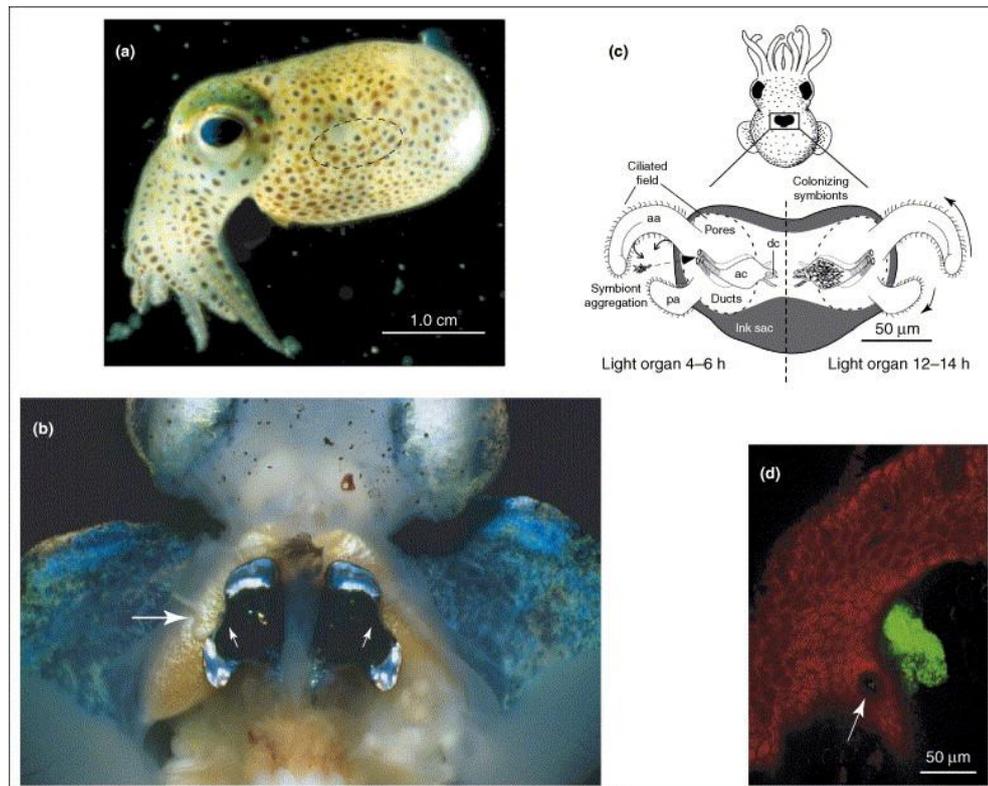


Figure 8 : Symbiose *V. fischeri*-*Euprymna scolopes*. a) Individu adulte de *E. scolopes*; la position approximative de l'organe lumineux dans la cavité du manteau est indiquée par le cercle. b) Une coupe ventrale de l'organe : les petites flèches indiquent les positions des pores et la grande flèche montre l'évacuation du contenu de la cavité. c) Coupe schématique de l'organe lumineux juvénile. A gauche : stade précoce. A droite : stade tardif dans la symbiose. d) : Microscopie confocale montrant l'agrégation des cellules de *V. fischeri* dans le mucus à côté du pore pendant l'initiation de la symbiose (Visick & Ruby 2006).

III-2 La pathogénie:

Un microorganisme est considéré comme pathogène si et seulement si, il répond aux conditions du postulat de Koch : 1) il est impliqué dans chaque cas de la maladie ; 2) il est isolé et identifié ; 3) l'isolat provoque la même maladie chez un sujet sain ; 4) il peut alors être ré-isolé de ce dernier. Néanmoins, il existe des limites à l'application de ces critères comme le fait que tous les microorganismes ne peuvent pas être cultivés. Ainsi en 1988 Fazlkow émet un postulat « moléculaire » adapté aux bactéries non cultivables (Paillard *et al.*, 2004b). On distingue cependant différentes catégories de pathogènes. Les pathogènes dits « vrais » qui causent systématiquement la maladie chez l'organisme hôte, et les pathogènes opportunistes. Ces derniers ne causent la maladie que dans certaines circonstances tels que le stress, l'immunodépression, une porte d'entrée artificielle (sondes urinaires, implants).

III-2-1 Les pathogènes de l'humain

On dénombre de nombreux pathogènes de l'homme et des animaux dans la famille des *Vibrionaceae*. Bien qu'il existe d'autres pathogènes humains tels que *V. mimicus*, *V. hollisae*, *V. metschnikovii*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. damsela*, *V. furnissii* et *V. cincinnatiensis* (Tantillo *et al.*, 2004), les espèces pathogènes les plus dangereuses et les plus décrites sont *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, et *V. vulnificus*. Toutefois, l'écologie d'une espèce donnée peut difficilement être extrapolée de l'écologie du groupe du fait de la diversité des stratégies spécifiques. Les caractéristiques écologiques des trois espèces de pathogènes de l'homme sus-citées sont bien distinctes. Elles sont présentées dans la suite de ce paragraphe.

V. cholerae

V. cholerae est l'agent responsable des pandémies de choléra qui ont ravagé le monde entre 1817 et 1923. A ce jour, les infections semblent avoir disparu dans les pays industrialisés mais elles continuent de toucher principalement les pays en voie de développement. Depuis 2006, on assiste à une recrudescence de la maladie, surtout dans des zones où le niveau sanitaire est bas. Depuis août 2008, une épidémie de cholera touche le Zimbabwe mais le nombre de cas est passé de 8000 par semaine en février à 100 par semaine en mai 2009 (http://www.who.int/csr/don/2009_06_09/fr/index.html). Cette maladie se caractérise par l'apparition brutale de fortes diarrhées qui peuvent causer une déshydratation sévère et la mort en l'absence de traitement. Différentes souches de la bactérie sont responsables de la maladie. Néanmoins les

souches des sérogroupes O1 (isolée par Koch en 1883) et O139 sont les plus virulentes. Le séro groupe O1, le plus répandu sur la planète, est représenté par le biotype El Tor (Sack *et al.*, 2004). Le séro groupe O139 n'a été observé à ce jour qu'en Asie. Très tôt, *V. cholerae* fut l'objet de diverses études écologiques. Au départ, l'on pensait que cette bactérie faisait partie de la flore normale de l'intestin humain et qu'elle pouvait passer de façon provisoire dans les organismes aquatiques. Cependant, elle a aussi été isolée chez 20 espèces d'oiseaux aquatiques (Ogg *et al.*, 1989) et elle est souvent associée aux mollusques bivalves et aux crustacées (Huq *et al.*, 1986). Depuis les travaux de Colwell *et al.*, (1981) et de West & Lee (1982), on sait aujourd'hui que *V. cholerae* est une bactérie autochtone des eaux côtières et estuariennes. En 1970 aux Etats-Unis, cette bactérie fut cultivée à partir d'eau de mer issue de la baie de Chesapeake (Joseph *et al.*, 1982) ainsi que dans d'autres estuaires par la suite. Les résultats de ces études ont montré qu'à faible température comme c'est le cas en hiver, il était impossible de cultiver *V. cholerae* à partir d'eau de mer. Diverses études ont montré que la température était un facteur principal dans la distribution et le cycle saisonnier de *V. cholerae*. Néanmoins en utilisant des techniques de comptage direct par fluorescence, Huq *et al.*, (1990) ont montré que cette bactérie était présente dans l'eau de mer tout le long de l'année. En hiver ou lorsque les conditions nutritives deviennent défavorables, cette bactérie, comme c'est aussi le cas de la plupart des *Vibrio*, persiste dans le milieu sous forme « VBNC » (Huq & Colwell, 1996). *V. cholerae* a aussi été détectée dans le sédiment, probablement grâce à sa capacité à rentrer dans l'état VBNC. Il possède en outre la capacité de s'attacher à diverses surfaces grâce à différentes structures telles que les pili ou fimbriae, les flagelles polaires, les exopolysaccharides, et des protéines telles que la chitinase. Grâce à la chitinase, ce *Vibrio* est capable d'utiliser la chitine comme source de carbone et d'azote pour survivre dans des conditions défavorables. Des études avaient déjà montré que le cycle de cette bactérie était lié à son attachement sur les petits crustacés tels que les copépodes (Huq *et al.*, 1983; Huq *et al.*, 1990; Tamplin *et al.*, 1990). Huq *et al.*, (2005) ont montré aussi l'implication de plusieurs autres facteurs intégrant la température, la salinité et le pH dans la distribution de *V. cholerae* dans l'environnement. *V. cholerae* est plus fréquemment isolé dans des eaux côtières où la salinité est très faible (Jiang, 2001; Jiang & Fu, 2001) et son incidence ne semble pas être liée à la présence des coliformes témoins de contaminations par des boues d'épandages.

V. vulnificus

V. vulnificus se distingue des autres *Vibrio* par sa capacité à fermenter le lactose. Chez les sujets atteints de maladies chroniques du foie, cette bactérie est responsable d'infections septicémiques graves pouvant entraîner la mort dans 50% des cas. Les infections se manifestent le

plus souvent suite à la consommation, la manipulation de fruits de mer contaminés ou par la contamination de blessures. Généralement l'infection entraîne des nécroses hémorragiques et l'altération des tissus aboutissant fréquemment à l'amputation de membres. C'est une bactérie planctonique et autochtone des environnements marins et estuariens. Elle préfère les climats tropicaux et a été isolée dans des eaux présentant des températures allant de 9°C à 31°C. Les plus fortes concentrations ont été obtenues dans des régions où la température dépassait les 18°C (Kaspar & Tamplin, 1993). La concentration de *V. vulnificus* dans un environnement est très corrélée à la température du milieu, quoique les températures limites de détection de ce *Vibrio* soient variables selon les techniques de détection (Kaysner *et al.*, 1987; Oliver *et al.*, 1982).

Dans le golf de Mexico, la concentration de *V. vulnificus* est deux fois plus élevée dans le sédiment que dans l'eau. Cependant dans une étude réalisée en Caroline du Nord, seulement une seule souche de *V. vulnificus* a pu être isolée du sédiment. Selon les auteurs, la nature du sédiment qui est majoritairement constitué d'argile expliquerait ce résultat (Pfeffer *et al.*, 2003). Les plus fortes concentrations de *V. vulnificus* sont souvent rencontrées à fortes températures et à salinité moyenne. Il existe une corrélation positive lorsque la salinité est en dessous de 15 psu et négative lorsqu'elle est au-dessus de 15 psu (Lipp *et al.*, 2001). *V. vulnificus* peut rester sous forme libre dans l'eau ou être attaché au zooplancton ou au phytoplancton. Sa concentration dans les mollusques et principalement les huîtres peut atteindre 10⁶ CFU/g d'huître durant les saisons chaudes (Motes *et al.*, 1998). Contrairement aux autres pathogènes entériques, il est plus difficile de dépurifier *V. vulnificus* des huîtres. Cette capacité à coloniser et persister dans les organes de l'huître lui est conférée par les pili de type IV (Paranjpye *et al.*, 2007).

V. parahaemolyticus

V. parahaemolyticus est l'agent étiologique de gastro-entérites survenant à la suite de la consommation de fruits de mer crus (coquilles, crustacés, poissons). L'infection se manifeste par des crampes abdominales, des diarrhées, des maux de tête, des nausées et des vomissements. Le taux de mortalité est d'environ 2% et l'issue est souvent bénigne. Les gastro-entérites sont provoquées par les souches dénommées KP⁺ (Kanagawa positive) qui sont capables d'hémolyse sur un milieu spécifique, milieu de Wagatsuma agar (Joseph *et al.*, 1982). Cette bactérie est aussi largement répandue dans les environnements côtiers et estuariens. On la trouve en grande quantité dans les mollusques bivalves, les crustacés, les poissons, le plancton et le sédiment. Comme *V. vulnificus*, il existe une grande variabilité saisonnière et spatiale dans la concentration de *V. parahaemolyticus*. Les quantités de souches détectées dans les huîtres des côtes atlantiques, pacifiques et des golfes des

Etats-Unis (DePaola *et al.*, 1990; Motes *et al.*, 1998) sont très différentes. Les plus fortes concentrations de *V. parahaemolyticus*, c'est-à-dire 110 CFU/g d'huître et 44 CFU/100 ml d'eau, sont observées dans les golfes où la température moyenne de l'eau est la plus élevée, avoisinant 22°C. Par contre dans le Pacifique, la température moyenne de l'eau est plus faible et les concentrations de *V. parahaemolyticus* détectées sont de 21 CFU/g d'huître et de 2 CFU/100 ml d'eau. D'autres études ont montré que le pourcentage d'huîtres contaminées par *V. parahaemolyticus* est supérieur à 90 % pendant les mois d'été où la température de l'eau est chaude, alors que ce pourcentage est seulement de 15 % à 10 °C (Cook *et al.*, 2002; Kaufman *et al.*, 2003). Sans surprise, la température mais aussi la salinité jouent un rôle important dans les variations spatiale et temporelle de cette bactérie. Il semble pourtant que la température joue le rôle le plus important dans la prévalence des souches pathogènes. Comme c'est le cas pour *V. cholerae* et *V. vulnificus*, la prévalence en fonction du cycle saisonnier de *V. parahaemolyticus* est régulée par la température, le zooplancton (DePaola *et al.*, 2003), et la salinité (DePaola *et al.*, 2000).

III-2-2 Les pathogènes des vertébrés marins

Plusieurs espèces de vibrions peuvent causer des maladies chez les vertébrés marins. Les plus étudiés sont *V. anguillarum* et *V. salmonicida* qui provoquent des pertes importantes chez les poissons d'aquaculture (Buller, 2004).

V. anguillarum comme son nom l'indique, a été décrit pour la première fois chez l'anguille en mer Baltique en 1909. Par la suite, il fut retrouvé chez d'autres poissons de l'Atlantique et du Pacifique, et il est à ce jour à l'origine des plus importantes mortalités touchant les poissons, en particulier les salmonidés. Bien qu'il arrive qu'aucun symptôme ne soit observé avant la mort de l'animal, l'infection provoque en général une septicémie hémorragique brutale, une nécrose du cœur, de la rate et des reins. Les yeux et l'intestin sont souvent également atteints. Quant à *V. salmonicida*, il sévit principalement au Canada et en Europe du Nord en hiver lorsque les températures sont inférieures à 15°C d'où le nom de la pathologie qu'il cause « Vibriose des eaux froides » (Thompson *et al.*, 2004a). L'infection par cette bactérie induit une septicémie hémorragique principalement chez le saumon *Salmo salar*, la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* et la morue *Gadus morhua*.

Très peu d'études écologiques ont été réalisées concernant ces bactéries. Les toutes premières études écologiques en environnement naturel ont montré que *V. salmonicida* était présent dans les sédiments de toutes les fermes aquacoles étudiées. Selon les auteurs, le sédiment servirait de réservoir pour cette bactérie pendant les périodes défavorables (Enger *et al.*, 1989). Hoff, (1989) a

montré également que la salinité tout comme la température étaient des facteurs qui pouvaient influencer la survie de ces deux bactéries dans l'environnement. Par la suite des études ont montré que *V. salmonicida* et *V. anguillarum* étaient capables de survivre en condition de stress. Lorsque les cellules de ces deux bactéries sont cultivées dans un milieu pauvre en nutriment, les concentrations de bactéries obtenues par comptage direct à l'acridine orange ou au DAPI restent stables pendant 60 semaines, tandis que le nombre d'unités formant colonies (UFC) chute régulièrement (Enger *et al.*, 1990).

III-2-3 Les pathogènes de coraux

On assiste depuis quelques années à une recrudescence des maladies du corail notamment les phénomènes de blanchiment (Harvell *et al.*, 1999; Rosenberg & Ben-Haim, 2002; Ward *et al.*, 2003). Le blanchiment du corail est lié à une anomalie dans la symbiose corail - zooxanthelles (microalgues photosynthétiques endosymbiotiques). La couleur blanche qui en résulte serait liée à une diminution de la concentration des pigments ou à une perte de zooxanthelles. De multiples facteurs sont mis en cause parmi lesquels une forte température, une baisse de la salinité, une augmentation de l'ensoleillement, et la présence de bactéries pathogènes. Parmi-celles-ci, des espèces du genre *Vibrio* telles que *V. shillonii* (Rosenberg & Falkovitz, 2004) et *V. coralliilyticus* (Ben-Haim *et al.*, 2003) ont été principalement identifiées. D'autre part, *V. alginolyticus* est incriminée dans la maladie jaune chez *Monastrea spp* en mer des Caraïbes (Cervino *et al.*, 2004).

III-2-4 Pathogènes des invertébrés marins

Chez les crustacés

Des affections dues aux *Vibrio* et touchant des espèces de crustacées ont été référencées. On citera par exemple : l'espèce *V. harveyi* chez le homard *Jasus verreauxi*, *V. anguillarum* et une souche apparentée à *V. fluvialis* chez le homard *Homarus americanus* (Bowser *et al.*, 1981; Tall *et al.*, 2003). Chez les crevettes pénéides, on dénombre plusieurs espèces de *Vibrio* qui occasionnent des mortalités et une chute des rendements de production. Les pertes les plus considérables sont dûes à la maladie dite lumineuse causée par l'espèce *V. harveyi* (Austin & Zhang, 2006; Robertson *et al.*, 1998). D'autres *Vibrio* tels que *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. penaeicida* et *V. nigripulchritudo* affectent aussi les crevettes (Alday-Sanz *et al.*, 2002; de la Pena *et al.*, 1997; Ishimaru *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996; Lightner & Redman, 1998; Liu *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1993). L'effet toxique de *V. penaeicida* responsable du « syndrome 93 » sur les crevettes a été

confirmé par balnéation et injection (Saulnier *et al.*, 2000). La température et la période de mue des crevettes sont les facteurs clés influençant la survenue de la maladie.

Chez les mollusques

De nombreuses études font état de l'isolement de bactéries lors d'épisodes de mortalités de mollusques au stade larvaire, naissain ou adulte et sur des populations sauvages ou d'élevage. Leur implication en tant que pathogènes a parfois été vérifiée par reproduction de la maladie en infection expérimentale.

Les *Vibrio* affectent les mollusques quels que soit leur famille, genre ou espèce. Par exemple, une souche de *V. lentus* fut incriminée dans une pathologie qui touche des populations de pieuvres sauvages *Octopus vulgaris* (Farto *et al.*, 2003). *V. alginolyticus* a été impliqué dans des cas d'ulcères cutanés chez la pieuvre *O. joubini* (Hanlon *et al.*, 1984). Cette espèce est aussi associée à des pathologies et à des épisodes de mortalités de l'ormeau (Liu *et al.*, 2001). D'autres espèces de *Vibrio* ont été identifiées et associées à des pathologies telle que *V. carchariae* dans des mortalités de l'espèce *Haliotis tuberculata* en France (Nicolas *et al.*, 2002).

Les mortalités associées aux bactéries, enregistrées chez les mollusques bivalves sont souvent attribuées à des vibrioses. Dans la majorité des cas, ces vibrioses atteignent les animaux au stade larvaire et en éclosion (Tableau 2). Des infections d'adultes par des *Vibrio* conduisant à des mortalités sont rares et dépendent des conditions environnementales et du statut physiologique de l'animal. Les espèces les plus couramment rencontrées sont *V. tapetis* responsable de la maladie de l'anneau brun chez la palourde *Ruditapes philippinarum* (Paillard *et al.*, 2004a; Paillard *et al.*, 2004b). Les espèces du groupe polyphylétique des *V. splendidus* (Le Roux *et al.*, 2002; Waechter *et al.*, 2002) ou encore l'espèce *V. aestuarianus* (Garnier *et al.*, 2007) sont associées à des mortalités chez l'huître *Crassostrea gigas*. Pour les espèces de *Vibrio* ainsi que les bivalves touchés, se référer au tableau suivant.

Données bibliographiques : Les bactéries du genre *Vibrio*

Tableau 2 : Synthèse des différentes espèces pathogènes des larves de bivalves, leurs hôtes et les symptômes associés

Espèces <i>Vibrio</i>	Symptômes associés	Hôte bivalve	Références
<i>V. tubiashii</i>	Nécroses des tissus, détachement du velum	<i>Crassostrea gigas</i>	Takahashi <i>et al.</i> , 2000
		<i>Crassostrea virginica</i>	Tubiash <i>et al.</i> , 1965
		<i>Ostrea edulis</i>	Lodeiros <i>et al.</i> , 1987
<i>V. tapetis</i>	Nécroses au niveau des tissus	<i>Tapes philippinarum</i>	Borrego <i>et al.</i> , 1996
<i>V. splendidus</i>	Non déterminés	<i>Crassostrea gigas</i>	Sugumar <i>et al.</i> , 1998
		<i>Ruditapes decussatus</i>	Gomez-Leon <i>et al.</i> , 2005
<i>V. pectinica</i>	Nécroses au niveau des tissus et synthèse d'une toxine	<i>Pecten maximus</i>	Lambert <i>et al.</i> , 2001; Nicolas <i>et al.</i> , 1996
<i>V. anguillarum</i>	Immobilisation et sédimentation des larves, Nécroses des tissus	<i>Mercenaria mercenaria</i> / <i>Crassostrea virginica</i>	Tubiash <i>et al.</i> , 1970; Tubiash, 1974
		<i>Ostrea edulis</i>	(Disalvo <i>et al.</i> , 1978)
<i>V. alginolyticus</i>	Nécroses des tissus, synthèse de toxine, déformation du velum, mortalités massives	<i>Ostrea edulis</i>	Lodeiros <i>et al.</i> , 1987; Nottage & Birkbeck, 1987; Tubiash <i>et al.</i> , 1970
		<i>Mercenaria mercenaria</i> / <i>Crassostrea virginica</i>	Tubiash <i>et al.</i> , 1970
		<i>Crassostrea gigas</i>	Estes <i>et al.</i> , 2004
		<i>Agropecten purpuratus</i>	Riquelme <i>et al.</i> , 1996
		<i>Agropecten ventricosus</i>	Sainz <i>et al.</i> , 1998

V. aestuarianus

V. aestuarianus a été isolé pour la première fois en 1983 par Tison et Seidler dans les estuaires des côtes d'Oregon (Etats-Unis) principalement dans l'eau de mer et les mollusques (Tison & Seidler, 1983). C'est une bactérie Gram négatif, oxidase positive, qui peut être droite ou incurvée. Elle est mobile grâce à la présence d'un flagelle polaire. Si la souche type ATCC 34548T ainsi que d'autres souches poussent sur milieu TCBS, toutes les souches n'y poussent pas. La température optimale de croissance de cette bactérie se situe entre 20°C et 25°C. Néanmoins elle peut pousser à 5°C et pour la souche type à 37°C. Il n'a été observé de bioluminescence chez aucune des souches isolées. Les souches de *V. aestuarianus* sont sensibles à une large gamme d'antibiotiques dont la vibriostatine 0/129, l'ampicilline, la kanamycine, le chloramphénicol. La composition en base G+C de l'ADN des souches de *V. aestuarianus* varie entre 43 et 44%. L'ADN de cette espèce présente moins de 25% d'homologie avec celui des espèces les plus proches phénotypiquement comme *V. splendidus*, *V. damsela*, *V. diazotrophicus* ou *V. anguillarum*. Parmi les espèces de *Vibrio* qui fermentent le lactose comme *V. cholerae* ou *V. vulnificus*, *V. aestuarianus* se distingue par son activité arginine dihydrolase et l'absence des ornithines et lysines décarboxylases. A sa découverte, elle n'était pas considérée comme pathogène. Le pouvoir pathogène de *V. aestuarianus* a d'abord été suspecté en réalisant des isollements à partir de l'hémolymphe d'huîtres moribondes de plusieurs sites entre 2001 et 2004. Lors de ces études, *V. aestuarianus* apparaissait être la bactérie majoritairement rencontrée et ce résultat laissait présager de l'implication de cette espèce dans les mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Son pouvoir pathogène a été par la suite démontré par des infections expérimentales, qui ont également mis en évidence que la capacité à induire des mortalités chez l'hôte variait selon les souches. Trois groupes ont pu être ainsi créés : le groupe 1 constitué des souches très virulentes qui, injectées à l'hôte, induisent 50% de mortalités en 24h ; le groupe 2 comprenant les souches modérément virulentes et le groupe 3 représentant les souches non virulentes (Labreuche, 2006). Labreuche *et al.*, (2006b) ont étudié le rôle dans la virulence des composés extracellulaires ou ECP des différentes souches par comparaison des effets des ECPs de deux souches, l'une virulente et l'autre non-virulente. Les résultats ont montré que les ECPs de la souche virulente induisent 80 % de mortalité chez l'hôte par rapport aux ECPs de la souche non-virulente qui n'induisent que 25 % de mortalité. Les ECPs de la souche virulente contiennent des enzymes ou des toxines telles que la caséinase, la gélatinase, la lécithinase et l'hémolysine qui ne sont pas présentes chez la souche non-virulente. L'activité protéasique est due à une métallo-protéase proche de celle de *V. anguillarum* qui est à l'origine de tous les effets délétères des ECPs sur les hémocytes et sur l'hôte.

VI Conclusion du chapitre

De nombreuses études s'intéressent à la relation entre les *Vibrio* pathogènes et leurs hôtes respectifs. Cependant, contrairement aux pathogènes humains et de poissons, aucune étude écologique n'a jusqu'à ce jour été entreprise sur les pathogènes d'invertébrés marins. Les études écologiques sur les pathogènes humains ou de poissons ont montré que ces derniers avaient une large gamme de niches écologiques, mais restent souvent cantonnés aux estuaires. Principalement isolés dans l'eau et les fruits de mer, ils peuvent parfois résider dans le sédiment. Le sédiment servirait de réservoir pendant les périodes défavorables comme en hiver. En effet, les *Vibrio* sont capables de s'attacher aux particules en suspension dans l'eau ainsi qu'au plancton. Ces particules peuvent se déposer dans le sédiment. Ces associations serviraient donc de véhicule de transfert des *Vibrio* entre l'eau et le sédiment d'une part et d'autre part entre l'eau et les animaux tels que les mollusques, les crevettes ou l'homme (Fries *et al.*, 2008). Dans le cadre de notre étude nous faisons cette même hypothèse : les sédiments des sites ostréicoles pourraient héberger des pathogènes tels que *V. aestuarianus* et notamment servir de réservoir pendant la saison hivernale. La seconde partie de cette analyse bibliographique présente une synthèse des connaissances sur l'huître creuse *C. gigas*.

L'huître creuse *Crassostrea gigas*

I Généralités

L'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) est appelée également huître japonaise ou huître du Pacifique. Au niveau phylogénétique, elle fait partie des 12 000 espèces du groupe des Lophotrochozoaires qui contient aussi les rotifères, les plathelminthes, les annélides, et les mollusques bivalves. Elle présente une grande tolérance aux variations des paramètres environnementaux comme la température, la salinité et la nourriture. Originaires d'Asie, ces huîtres ont de nos jours une répartition géographique mondiale du fait des vagues d'importations pour l'aquaculture. On les retrouve aux États-Unis (côte ouest), au Canada, en Nouvelle-Zélande, en Tasmanie, en Russie et en Europe (Huvet *et al.*, 2000). Le domaine de prédilection de l'huître creuse est constitué des environnements intertidaux, côtiers ou estuariens qu'elle peut coloniser lorsque les conditions sont favorables (Schmidt *et al.*, 2008). Les sites de culture se situent en général dans ces mêmes zones, mais également à des niveaux plus profonds non découvrants allant jusqu'à 20 mètres de profondeur comme en baie de Quiberon. On parle alors de culture en eau profonde.

II. Caractéristiques biologiques

L'huître creuse fait partie des animaux dits à corps mou, dont la chair est enveloppée par une coquille à deux valves. La valve supérieure située à droite est plane tandis que la valve inférieure est creuse. Elles sont articulées autour d'une charnière et sont fermées par un muscle adducteur. Le corps de l'huître est entouré d'un manteau qui sécrète la coquille et dont les deux lobes sont soudés au niveau dorsal près de la bouche. Le manteau délimite la cavité palléale et forme dans la partie antérieure un capuchon céphalique recouvrant les quatre palpes labiaux et la bouche. À l'intérieur, les branchies assurent les fonctions de respiration et de nutrition. (Figure 9)

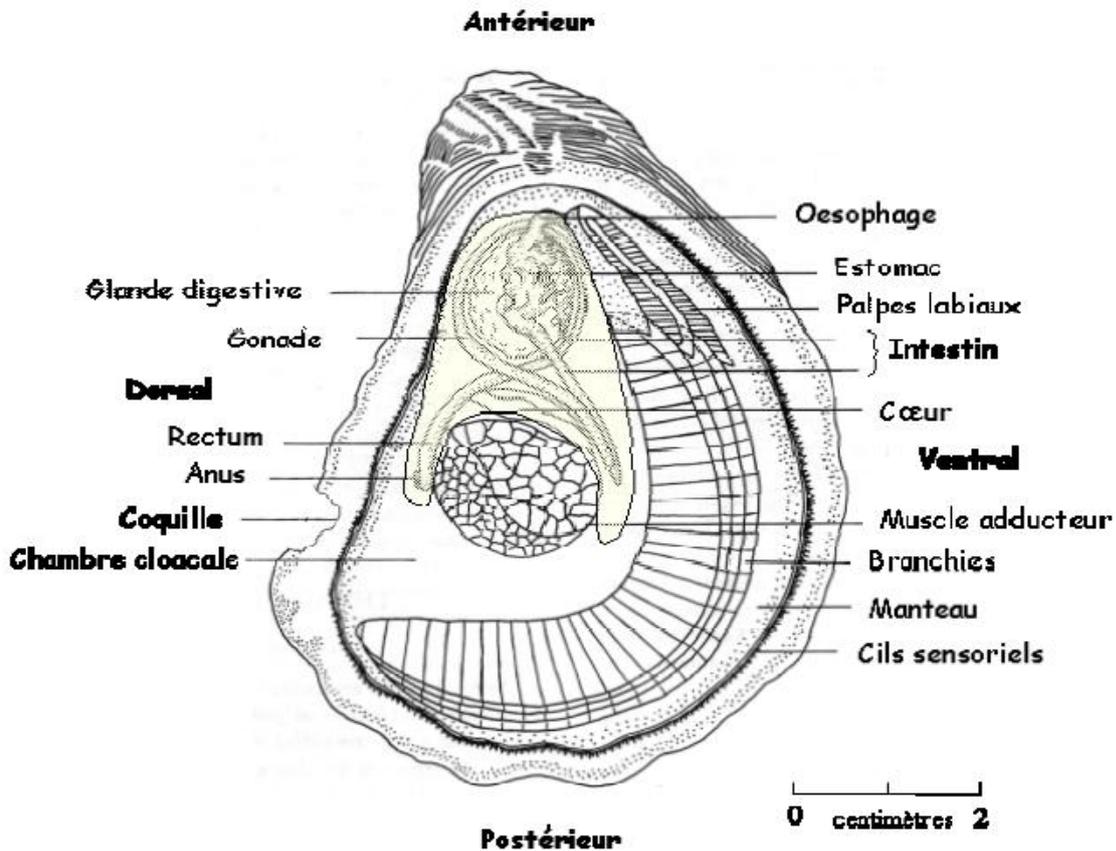


Figure 9 : Plan d'organisation d'un *Crassostreidé* (valve gauche) (Galtsoff, 1964)

L'appareil circulatoire est un système semi-clos composé de vaisseaux et de sinus cœlomique. Le cœur situé contre le muscle adducteur dans la cavité péricardique comporte deux oreillettes et un ventricule. Ce dernier distribue le fluide circulant d'hémolymphe dans les aortes antérieure et postérieure. L'hémolymphe circule dans les artères et les artérioles, puis dans des sinus de taille variable qui mettent les organes au contact direct avec l'hémolymphe. Cette dernière est épurée dans le rein puis circule vers les branchies par les vaisseaux afférents et en repart après hématose, par les vaisseaux efférents jusqu'aux oreillettes. (Figure 10).

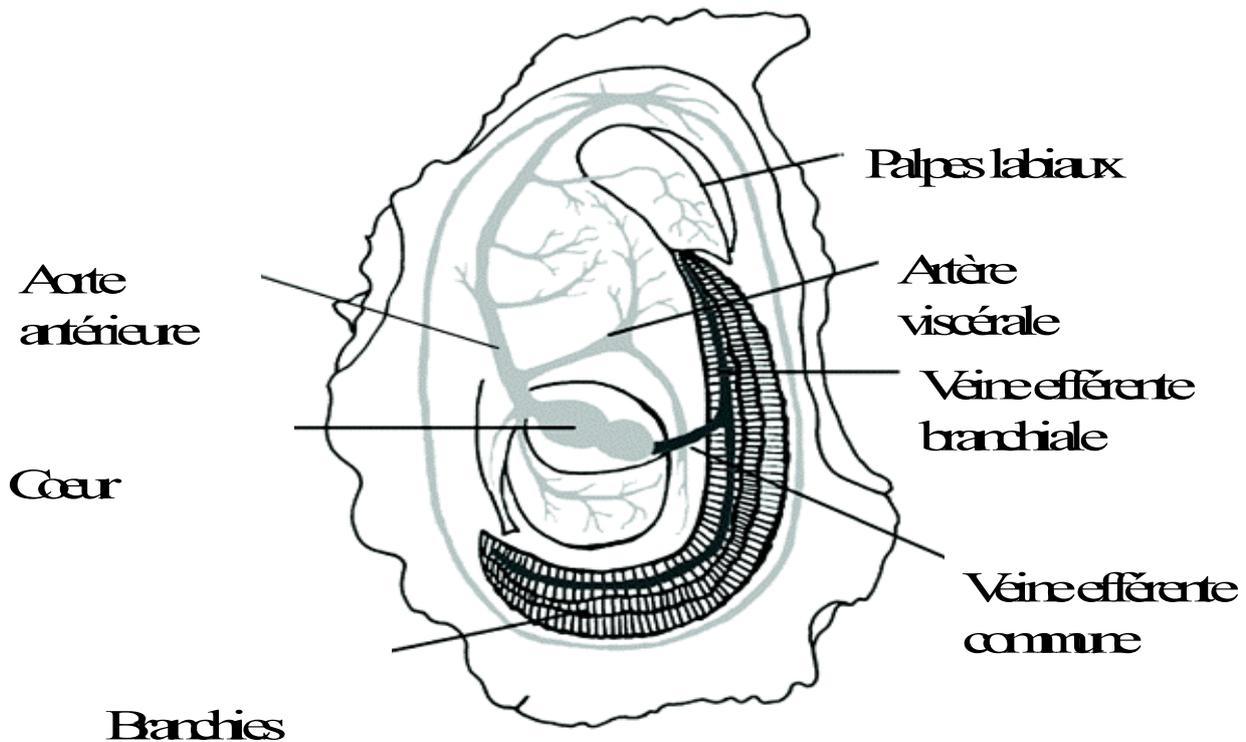


Figure 10 : représentation schématique du système circulatoire de *Crassostrea gigas* (Bachere *et al.*, 2004)

II.1. Reproduction

Les huîtres creuses présentent un hermaphrodisme protandre, de type alternatif irrégulier (Galtsoff, 1964). En général, les individus atteignent la maturité d'abord comme mâles et les huîtres plus âgées montre une prédominance de femelles. Les changements de sexe s'alternent entre deux saisons de reproduction (Guo *et al.*, 1998). Dans les zones avec un fort apport en nourriture, le sex-ratio chez les huîtres montre une prédominance de femelles, tandis que l'inverse est vrai dans les zones pauvres. La reproduction comprend globalement trois phases : 1) une phase de repos sexuel qui se situe à l'automne et au début de l'hiver, 2) une phase de gonadogénèse qui commence par un développement très actif des cellules germinales à la fin de l'hiver et qui s'accélère au printemps avec leur maturation (gamétogénèse) (Lango-Reynoso *et al.*, 1999; Lango-Reynoso *et al.*, 2000). Cette phase de maturation se termine par l'émission des gamètes mâles et femelles lors de la période estivale. Elle se produit une à deux fois par an et la fécondation a lieu en « pleine eau ». La dernière phase est une phase de résorption gonadique. Après la fécondation, le développement de l'œuf se

Données bibliographiques : L'huître creuse *Crassostrea gigas*

fait progressivement en passant des stades morula, blastula, gastrula et larve trochophore. La larve trochophore se différencie ensuite en larve véligère, en forme de D caractéristique des larves d'huîtres. Pendant sa phase larvaire, l'huître est pélagique et planctotrophe. Elle se transforme par la suite en une larve pédivéligère qui se fixe au substrat pour ensuite subir la métamorphose aboutissant à un juvénile présentant toutes les caractéristiques de l'animal adulte. (Figure 11)

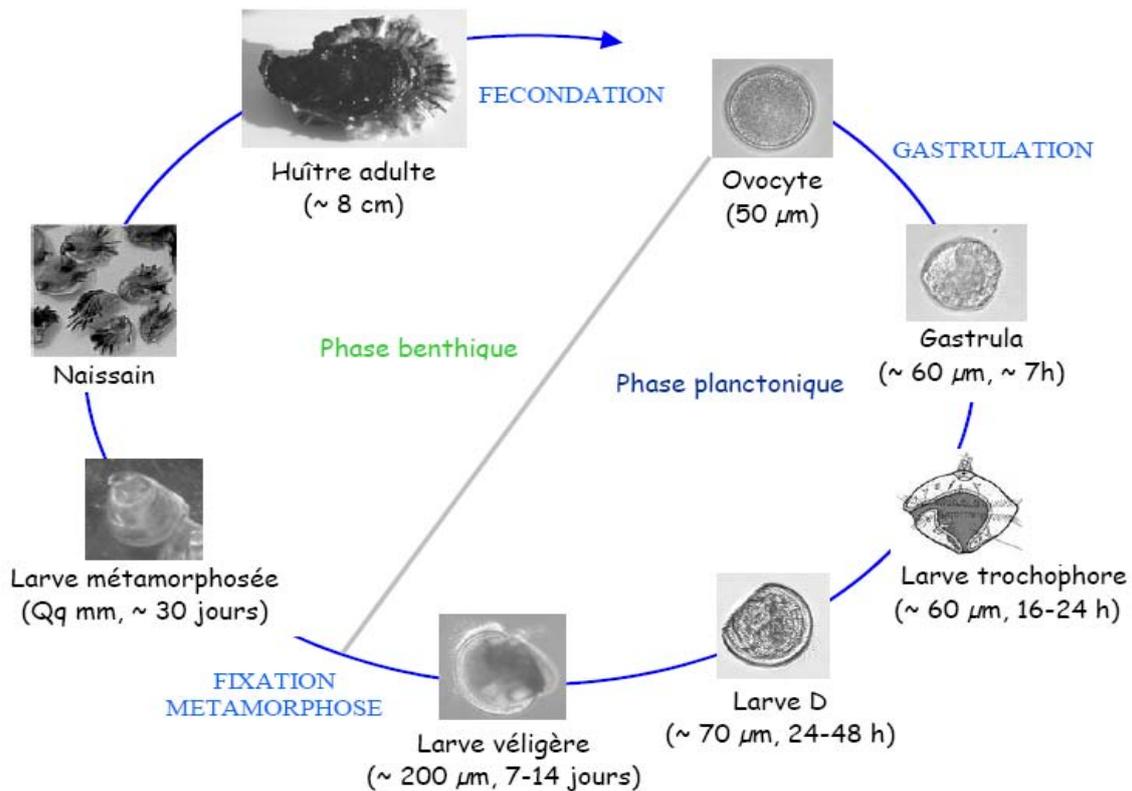


Figure 11: Cycle de développement de *Crassostrea gigas*

II.2. Le système immunitaire des mollusques bivalves : chez l'huître *C. gigas*

Les relations bactéries-mollusques bivalves

A l'instar des autres invertébrés marins, les mollusques bivalves, notamment l'huître creuse *C. gigas*, accumulent dans leur cavité palléale et dans leur système digestif une grande variété de communautés bactériennes. Le caractère semi-ouvert de leur système circulatoire et leur capacité de filtration ne permettent pas d'établir de barrières physiques entre l'organisme et son milieu de vie et

cette caractéristique explique probablement la covariation de la flore bactérienne de l'environnement et de la flore bactérienne interne de l'huître. Il semble pourtant que malgré l'apparente absence de barrières entre son organisme et le milieu extérieur, seule une partie des bactéries de l'environnement est retrouvée à l'intérieur des tissus de l'hôte. Il existe une sélection par filtration des bactéries de l'environnement - par leur taille et par leur attachement ou non à des particules - ce qui fait que la composition des bactéries retrouvées dans les mollusques bivalves diffère cependant de celle de l'eau.

Un tri s'opère également entre celles qui vont subsister dans le tube digestif, s'y développer et celles qui vont être rapidement digérées.

La plupart des études antérieures attestent que la majorité des espèces de la flore bactérienne des bivalves appartient aux groupes des γ -*proteobacteria*, des CFB (*Cytophaga-Flavobacterium*) et des α -*proteobacteria*. La composition des espèces à l'intérieur de ces différents groupes varie en fonction de l'environnement et de l'espèce de bivalve (Kurahashi & Yokota, 2002; Romanenko *et al.*, 2008).

Des espèces du genre *Pseudoalteromonas* ou *Alteromonas*-like sont très souvent associées aux invertébrés marins. Dans leur récente étude, Romanenko *et al.*, (2008) ont rapporté que la majorité des espèces isolées présentes chez les mollusques bivalves sont des *Pseudoalteromonas* et des *Psychrobacter*, des *Sphingomonas* et des *Sulfatobacter*. Des bactéries Gram positif telles que *Bacillus* et *Paenibacillus* sont aussi détectées mais moins représentées.

Chez les huîtres creuses bien que la composition de la microflore soit variable selon les sites d'échantillonnage, les groupes dominants sont souvent les mêmes. Ainsi, l'étude de la microflore de l'huître *C. virginica* échantillonnée dans trois sites proches de Washington, a révélé que la microflore était principalement composée de bactéries appartenant aux genres *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* et (Colwell & Liston, 1960). L'appartenance de ces bactéries à ces genres serait néanmoins à revoir suivant les nouvelles méthodes de taxonomie. Les prélèvements réalisés à partir d'huîtres *C. virginica* dans la baie de Chesapeake ont montré la prédominance des bactéries du genre *Vibrio* (~ 50% de la microflore totale pour un des sites) (Lovelace *et al.*, 1968). D'autres études ont montré pour cette même espèce d'huître, des résultats sensiblement différents, le genre *Pseudomonas* comptant pour 31,2 % de la microflore totale, *Flavobacterium/Cytophaga* pour 26 % et le genre *Vibrio* pour 25% (Murchelano & Brown, 1968). En 1981, les travaux de Prieur sur la microflore bactérienne de différentes espèces de mollusques bivalves ont indiqué une forte proportion de bactéries appartenant aux genres *Photobacterium* et *Vibrio* (Prieur, 1981).

Les *Vibrio* représentent donc une part importante de la flore cultivable associée aux bivalves, quelles que soient les conditions environnementales. Certaines de ces bactéries peuvent constituer

une flore commensale chez les bivalves tandis que d'autres peuvent être des pathogènes ou des opportunistes qui peuvent causer des maladies résultant d'une combinaison de facteurs d'origine interne (faiblesse physiologique de l'hôte, stress...) ou externe (températures élevées par exemple), comme c'est le cas lors des mortalités estivales de l'huître creuse *C. gigas*.

Le système de défense chez les mollusques : l'huître creuse

Le système immunitaire de l'huître *C. gigas*, ainsi que celui des autres mollusques bivalves est dit « inné ou non spécifique ». Les mécanismes de défense des bivalves ont été étudiés pour quelques espèces d'intérêt économique comme les huîtres, les palourdes et les moules (Bachere *et al.*, 2004; Cheng, 1996; Fisher, 1986). Les défenses de l'organisme sont assurées par l'action combinée de deux types de réactions, l'une à médiation cellulaire et l'autre à médiation humorale. La médiation cellulaire est assurée par les hémocytes chez l'huître. Les hémocytes sont des cellules de l'hémolymphe qui circulent et migrent à l'intérieur des tissus voisins grâce à des phénomènes de chimiotactisme (Howland & Cheng, 1982). Ces cellules sont extrêmement hétérogènes et ont été classées au départ en deux grands groupes de cellules, les hémocytes granulaires (granulocytes) et les hémocytes sans granules ou avec très peu de granules (agranulocytes ou hyalinocytes) (Figure 12). Chez beaucoup de bivalves, les granulocytes sont les cellules majoritaires mais sont classées en plusieurs sous-catégories en fonction du type de granules ainsi que du niveau d'activité de phagocytose (Fryer & Bayne, 1996). Les granulocytes forment un groupe relativement homogène caractérisé par la présence de granules. Ce n'est pas le cas des agranulocytes, qui sont hétérogènes et se caractérisent par une absence ou une présence limitée de granules intra-cytoplasmiques. L'origine des hémocytes est encore méconnue mais, il a été suggéré qu'ils pourraient provenir de la différenciation de cellules du tissu conjonctif (Cheng, 1981). Plus récemment Tirape *et al.*, (2007) ont montré par des hybridations *in situ* que les hémocytes se forment à partir des cellules des parois des vaisseaux. Les hémocytes interviennent dans la réponse cellulaire aux attaques de l'organisme bivalve et participent à la phagocytose.

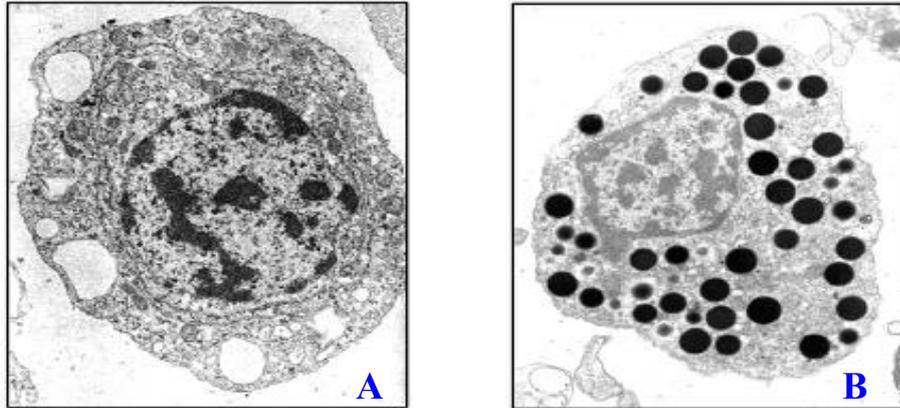


Figure 12: Les types d'hémocytes présents chez *Crassostrea gigas*. A- hyalinocytes; B- granulocytes (Bachère *et al.*, 2004).

La réponse humorale est quant à elle effectuée par des constituants de la portion fluide de l'hémolymphe. Citons par exemple les lectines, les enzymes lysosomales (phosphatase, lysozyme...) et différents peptides anti-microbiens (Leippe & Renwartz, 1988; Mitta *et al.*, 2000; Tunkijjanukij *et al.*, 1998).

Les différents mécanismes de défense sont décrits ci-dessous.

La Phagocytose

Le processus de phagocytose par les hémocytes se déclenche en présence d'un corps étranger (virus, bactéries, particules inorganiques, organismes pathogènes ou non) au sein ou au contact de l'organisme. Il se déroule en plusieurs étapes :

- i) la discrimination entre le soi et le non-soi ainsi que fixation du non-soi par l'hémocyte repose sur un système de récepteurs/molécule de reconnaissance. Chez les mollusques marins plusieurs molécules de reconnaissance ont été identifiées, parmi lesquelles on peut citer les lectines qui sont des glycoprotéines capables de se lier aux composés carbohydrates généralement présents à la surface des microorganismes (Olafsen *et al.*, 1992; Vasta *et al.*, 1984).
- ii) l'internalisation du corps étranger dans l'hémocyte selon un mécanisme faisant intervenir des phénomènes de remaniement du cytosquelette. Trois modèles d'internalisation des particules étrangères par les hémocytes de bivalves ont été proposés (Cheng, 2000b) (Figure 13).
- iii) enfin la dégradation intracellulaire de l'élément phagocyté par la production d'espèces oxygénées réactives encore connues sous le terme de « bouffée respiratoire » et/ou par la libération d'autres molécules cytotoxiques comme les enzymes lysosomales, de type phosphatases acides (Bachere *et al.*, 1995; Chu, 2000).

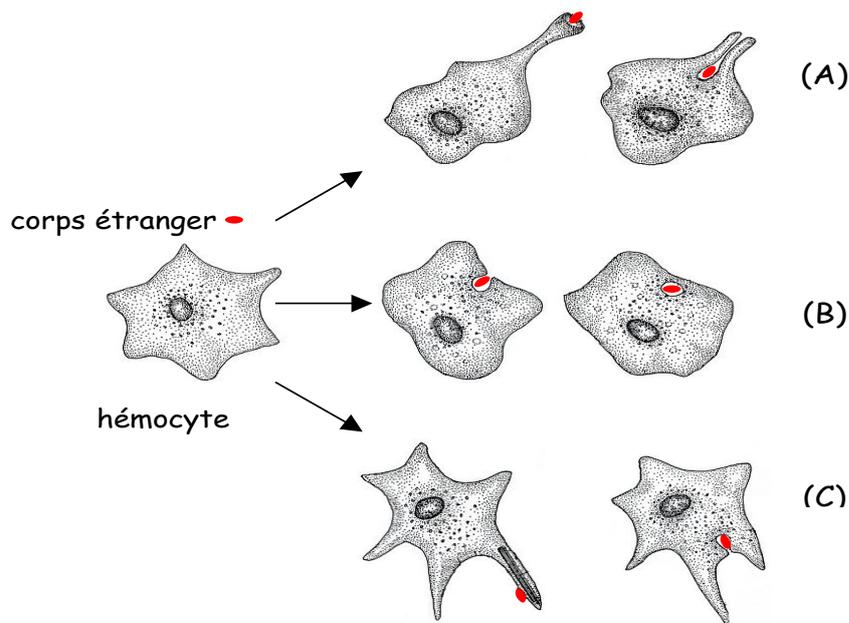


Figure 13: Les différents processus d'internalisation lors de la phagocytose par les hémocytes. A: les particules entrent dans les phagosomes par l'intermédiaire de pseudopodes ; B : vacuoles d'endocytose qui englobent les particules après leur adhésion à la surface de la cellule ; C : des pseudopodes qui entourent les particules, qui sont ensuite englobées dans des phagosomes. (Cheng, 2000)

La réponse humorale

La réponse humorale fait intervenir des molécules solubles à fonctions cytotoxiques qui peuvent être réparties en deux catégories :

- i) les effecteurs issus de cascades protéolytiques comme la cascade du complément, la cascade de coagulation, ou encore la cascade d'activation de la prophénoloxydase, qui aboutissent à la formation de complexes cytotoxiques. La cascade d'activation de la prophénoloxydase a été initialement identifiée chez les mammifères (Hearing & Tsukamoto, 1991) et les arthropodes (insectes, crustacés) (Cerenius & Soderhall, 2004). Peu d'informations sont disponibles chez les bivalves marins concernant les autres types de cascades protéolytiques. Ce système enzymatique est impliquée au cours du processus d'internalisation des pathogènes par les hémocytes et on considère qu'il participe à la réaction homéostatique et aux mécanismes de réparation des blessures.
- ii) les effecteurs à action cytotoxique directe tels que les inhibiteurs de protéases et les peptides anti-microbiens.

Les inhibiteurs de protéases interviennent dans la régulation des cascades protéolytiques endogènes, et agissent également contre les protéases sécrétées par les pathogènes (Calkins &

Sloane, 1995). Ainsi, l'hémolymphe des huîtres *C. virginica* et *C. gigas* présente des activités inhibitrices contre de nombreuses protéases exogènes, dont les protéases sécrétées par des pathogènes microbiens comme *Perkinsus marinus* et *V. vulnificus* (Faisal *et al.*, 1998). Récemment, deux gènes codant des protéines exprimés spécifiquement dans les hémocytes comportant la structure et la signature caractéristiques de la famille des TIMPs (pour tissu inhibitor of metalloproteinase) de vertébrés ont été récemment caractérisés chez *C. gigas* (désignés *Cg-timp* 1.1 et *Cg-timp* 1.3). Ils seraient impliqués dans des mécanismes de défense (Montagnani *et al.*, 2001; Montagnani *et al.*, 2005). Chez les vertébrés, les TIMPs interviennent à différents niveaux dans la réaction inflammatoire par leur action régulatrice sur les métalloprotéases de la matrice extracellulaire ou lors d'interactions avec des protéines inflammatoires (Brew *et al.*, 2000).

Les premiers peptides antimicrobiens connus chez les bivalves ont été identifiés chez les moules *Mytilus galloprovincialis* et *M. edulis* (Charlet *et al.*, 1996; Mitta *et al.*, 1999a; Mitta *et al.*, 1999b; Mitta *et al.*, 2000a). Ce sont des peptides cationiques, riches en cystéine dont les spectres d'activité antimicrobienne sont complémentaires : les défensines et myticines sont essentiellement actives contre les bactéries à gram positif, les myticines sont strictement antifongiques tandis que les mytilines ont un spectre d'activité plus étendu. Le peptide antimicrobien de *C. gigas* (*Cg-Def* pour *Crassostrea gigas* defensin) (Gueguen *et al.*, 2006) est fortement exprimé dans le manteau et présente une action microbicide essentiellement dirigée contre les bactéries à gram positif tandis que le peptide de *C. virginica* (*AOD* pour american oyster defensin) (Seo *et al.*, 2005) semble quant à lui exprimé constitutivement dans les hémocytes et possède un spectre d'activité plus large. Néanmoins à ce jour, leur implication exacte dans les mécanismes de défense de l'huître creuse n'est pas encore connue.

III. Conclusion du chapitre

Il existe chez l'huître une diversité de mécanismes de défenses complémentaires qui permettent de lutter contre les agressions du milieu environnant. Toutefois, malgré ces mécanismes de défense, de nombreuses espèces de bactéries surtout du genre *Vibrio* sont capables de persister et/ou de déclencher une maladie chez les bivalves, grâce notamment à des systèmes de défense contre les attaques de l'hôte mais aussi du fait de l'affaiblissement passager du système immunitaire induit par différents stress exogènes. Les huîtres sont des organismes filtreurs dont la composition de la flore bactérienne est dépendante de celle de l'eau environnante. Les bactéries marines peuvent circuler entre l'eau de mer et le sédiment. Par conséquent, le sédiment par sa nature chimique et selon sa composition bactérienne peut représenter un risque dans les mortalités estivales de *C. gigas*.

Données bibliographiques : L'huître creuse *Crassostrea gigas*

La troisième partie des analyses bibliographiques fait le point sur les connaissances générales et la composition bactérienne des sédiments.

Les sédiments

I. Généralités

Le sédiment est un dépôt de matériel meuble d'origine minérale ou biogénique de nature très variée et n'ayant pas encore subi de transformation. Ce dépôt devient rapidement le siège de divers processus de diagénèse qui aboutissent à la formation de roche sédimentaire à travers les particules qui le constituent. On parle généralement de sédiment lorsque le dépôt est récent, localisé dans un milieu naturel de formation et gorgé d'eau. Les particules solides qui constituent le sédiment peuvent être de la matière organique (en général moins de 1% en masse pour les sédiments côtiers et 0.1% en province océanique) provenant d'organismes aquatiques.

Il existe différentes sortes de sédiments selon la nature de l'environnement aquatique (l'origine des particules et du mode de dépôts, topographie de fond, courantologie, etc). On citera par exemple les sédiments marins côtiers, les sédiments des milieux profonds, d'eaux douces et d'estuaires, de mangroves ou de fjord. Les sédiments deviennent de plus en plus anoxiques avec la profondeur. Ils sont le siège de divers processus biogéochimiques qui impliquent les différents cycles de la matière tels que les cycles du carbone, de l'azote, du soufre et du phosphore. Ces activités sont dépendantes de la quantité et de la nature de matières organiques déposées mais aussi des types de bactéries présentes. Selon la vitesse de dégradation de la matière organique et par conséquent la vitesse de consommation de l'oxygène il se forme un gradient à l'intérieur du sédiment dans laquelle se succèdent divers accepteurs d'électrons souvent accompagné de la diminution des potentiels redox (Figure 14).

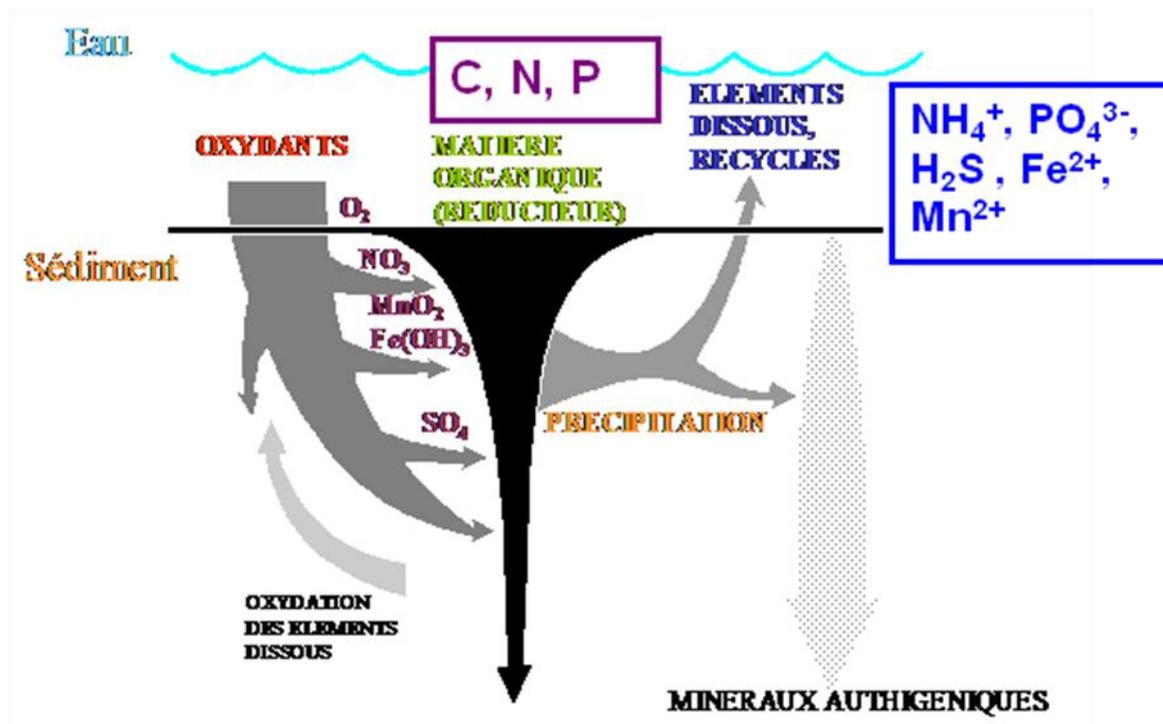


Figure 14 : Processus diagénétiques dans les sédiments côtiers

II. Les cycles biogéochimiques

II.1 Le cycle du carbone

Le carbone est un constituant élémentaire de toute molécule organique et se retrouve dans le matériel cellulaire. Son cycle est présenté dans la figure 15. Il peut se trouver sous forme organique comme sous forme inorganique notamment le dioxyde de carbone utilisé comme source de carbone par les organismes autotrophes tels que les plantes, les algues, les bactéries photosynthétiques, les lithotrophes et les méthanogènes. Le CO_2 est produit par les organismes hétérotrophes comme la plupart des procaryotes et les animaux. Les bactéries hétérotrophes utilisent le carbone organique lors de la décomposition des matières organiques pour leur croissance en aérobiose comme en anaérobiose et libèrent le CO_2 .

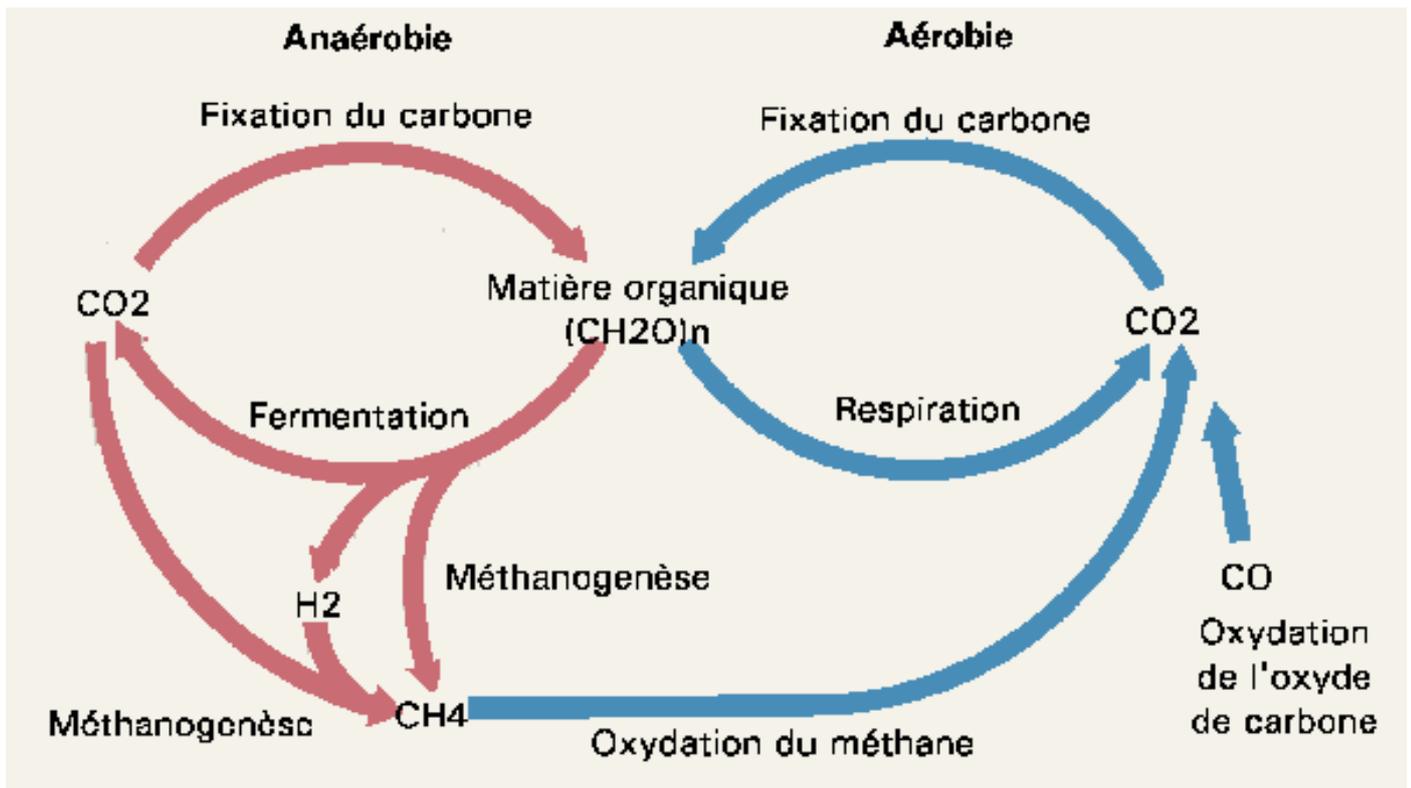


Figure 15 : Représentation du cycle du carbone

II.2 Cycle de l'Azote :

Il existe plusieurs étapes dans le cycle de l'azote (Figure 16).

La fixation : c'est l'étape de réduction de l'azote atmosphérique N₂ en ammoniac. Elle est effectuée d'une part par des bactéries autonomes des sédiments ou des sols aérobie (*Azotobacter*) ou anaérobie (*Clostridium*) et d'autre part des bactéries vivant en symbiose avec des plantes telles que les rhizobiacées.

Assimilation de l'ammonium et l'ammonification : Les bactéries qui fixent l'azote atmosphérique, assimilent l'ammonium formé pour augmenter leur biomasse. A la mort des cellules, la matière organique azotée est décomposée en ammonium par le processus d'ammonification.

La nitrification : Comme nous l'avons précédemment, cette étape est assurée de préférence en aérobie par les bactéries du groupe fonctionnel dit «nitrifiantes». Les premiers transforment

Données bibliographiques : Le sédiment

l'ammonium en nitrites tandis que les suivant utilisent les nitrites pour former les nitrates. Les nitrates sont alors incorporés en absence d'ammonium dans le milieu pour produire de la biomasse.

La dénitrification : c'est le processus dans lequel les bactéries utilisent les nitrates ou les nitrites comme accepteurs finaux d'électrons.

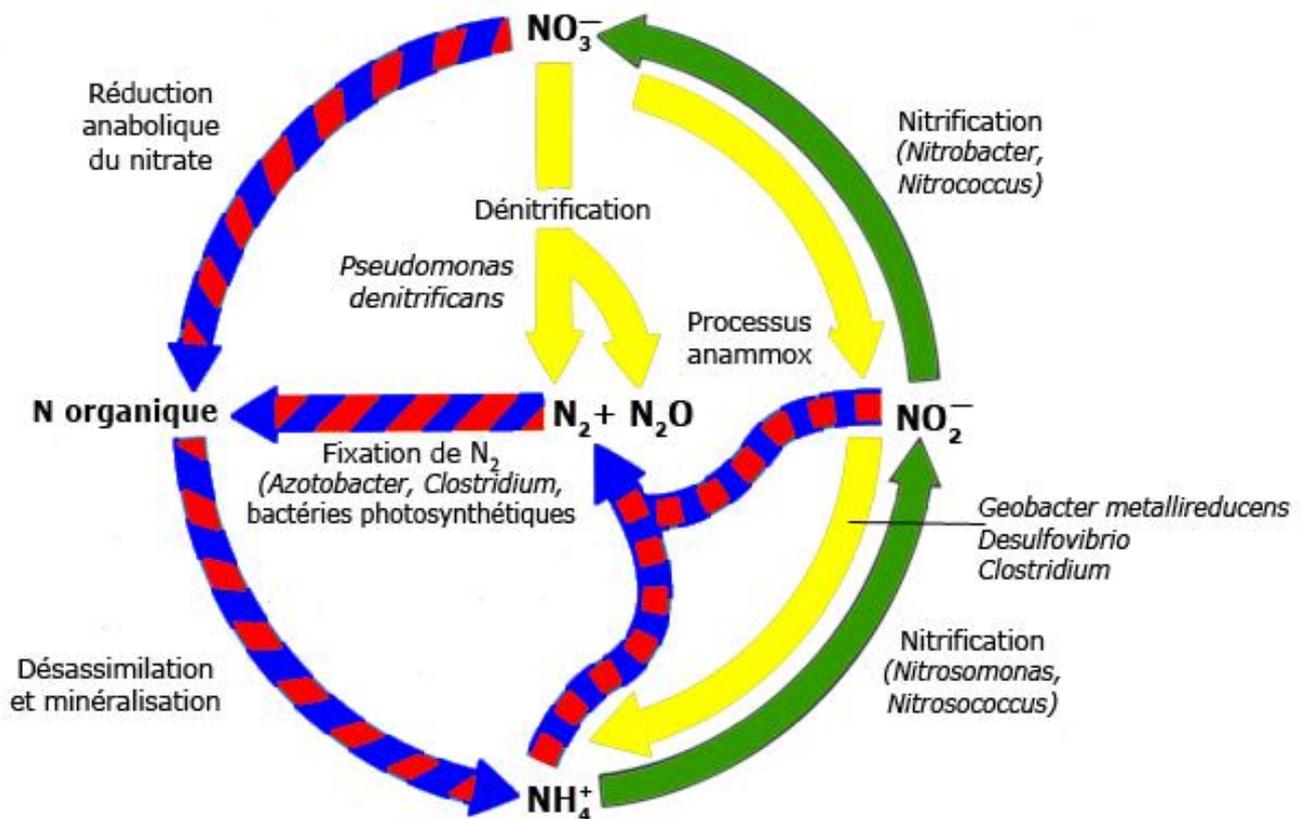


Figure 16: Représentation du cycle de l'azote

II.3 Le cycle du soufre :

Il comporte trois phases (Figure 17).

L'assimilation des sulfates et la minéralisation du soufre organique : Dans cette étape, les bactéries assimilent le soufre contenu dans les sulfates pour former les sulfures qui par la suite sont transformés dans les cellules pour donner des composés organiques tels que les acides aminés

Données bibliographiques : Le sédiment

soufrés. La minéralisation du soufre se produit aussi bien en aérobie qu'en anaérobie lorsque les molécules organiques sont décomposées en soufre.

L'oxydation du soufre : Cette étape peut être réalisée par deux types de microorganismes : les bactéries chimiolithotrophes en aérobie et les bactéries phototrophes en anaérobie. Elle consiste en l'oxydation des sulfures en soufre élémentaires puis en sulfates.

La sulfo-réduction : La réduction du soufre peut être réalisée dans une respiration anaérobie par des bactéries sulfato-réductrices qui utilisent le soufre élémentaire comme accepteur final d'électron. D'autres bactéries comme les *Desulfovibrio* utilisent les sulfates comme accepteurs finaux d'électron et réalisent la réduction du sulfate.

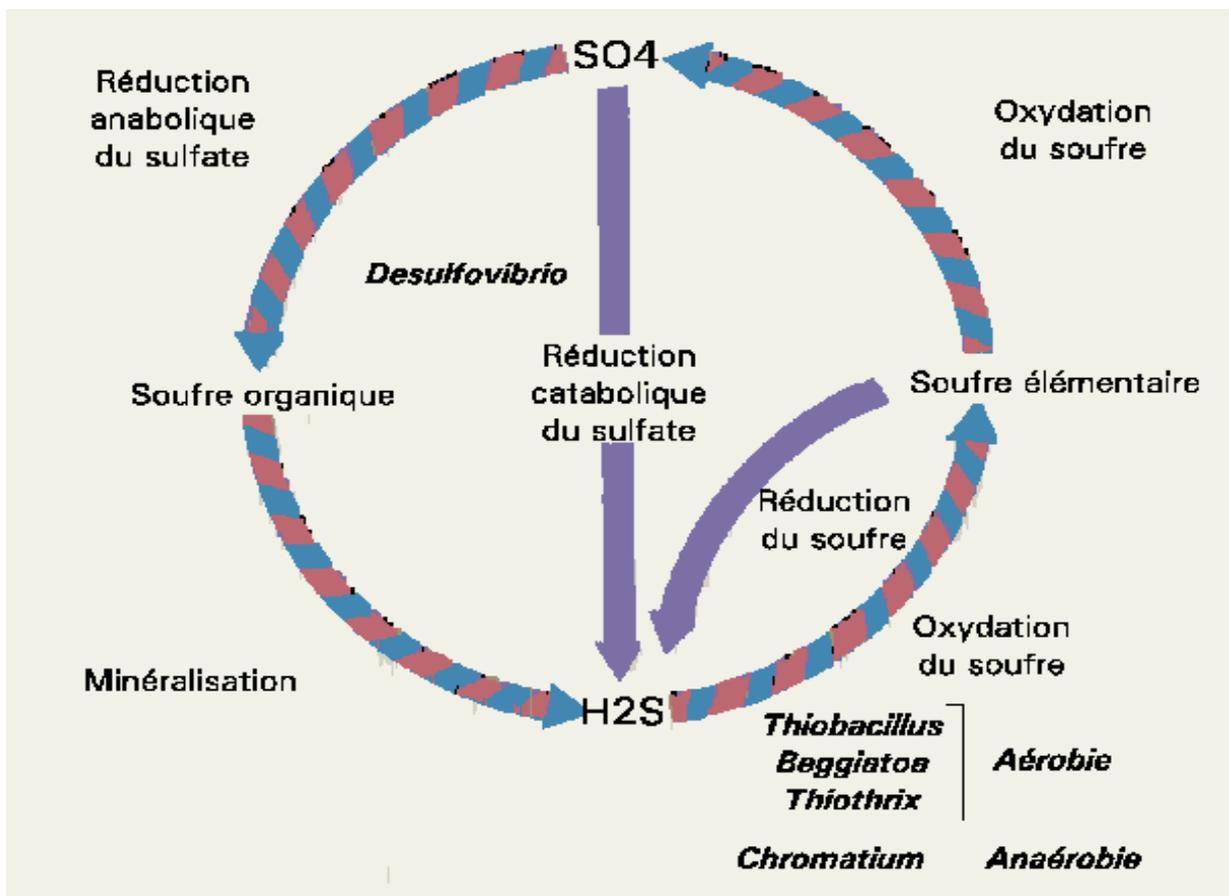


Figure17: Représentation du cycle du soufre

II.4 Le cycle du phosphore :

Une grande quantité de phosphore est introduit dans les milieux aquatiques par décomposition ou par apports anthropiques. Une partie de ce phosphate organique est transformée par des bactéries en phosphate inorganique. Ensuite, il y a conversion du phosphate inorganique en ortho-phosphate (PO_4) soluble dans l'eau et utilisé par de nombreux organismes y compris les bactéries elles-mêmes et l'autre partie est ensevelie dans le sédiment. Les microorganismes présents dans les sédiments jouent un rôle important dans la biodisponibilité du phosphore ce dernier étant souvent un facteur limitant dans l'environnement.

III Les bactéries du sédiment

Les sédiments hébergent diverses populations de microorganismes qui sont métaboliquement versatiles et utilisent une large gamme de donneurs organiques ou inorganiques d'électrons. De même, ils sont capables d'utiliser divers accepteurs d'électrons pour la respiration en l'absence d'oxygène. Ces bactéries ont un rôle important dans les processus biogéochimiques des sédiments et des sols.

III.1 Les populations bactériennes des sédiments

Les méthodes de biologie moléculaire ont considérablement accru les connaissances sur les populations des bactéries dans l'environnement. Ces méthodes sont de plus en plus utilisées dans la détermination de la composition de la flore bactérienne des sédiments.

Les clones de sédiments étaient très peu représentés dans la banque de données RDP (ribosomal database project : <http://rdp.cme.msu.edu/>) dans les années 90s (Kemp, 1990), mais leur nombre ne cesse d'augmenter depuis quelques années déjà. La composition bactérienne des sédiments est fonction de la nature du sédiment. On ne trouve pas les mêmes populations dans les sédiments d'eaux douces et les sédiments marins ou des mangroves, par exemple, et les sédiments anoxiques ne contiennent pas les mêmes populations dominantes que les sédiments oxiques. En effet, plus de 95 % ne présentent pas de similarité avec un genre connu. Les communautés bactériennes des sédiments sont distinctes de celles de l'eau, du sol et d'autres habitats. Ceci souligne la limite des échanges entre le sédiment et l'eau.

La caractérisation des communautés bactériennes dans les sédiments en eaux profondes fut l'un des principaux enjeux dans le domaine de l'écologie microbienne. La composition des communautés bactériennes des sédiments profonds a été caractérisée principalement via la méthode du clonage-séquençage (Li *et al.*, 1999; Polymenakou *et al.*, 2005). Ces constructions ont révélé que les Alpha-, Beta-, Gamma- et Delta-*proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes* et les

Planctomycetes sont très fréquents dans la plupart des environnements marins. De même, les *Gamma-proteobacteria* sont souvent retrouvés dans ces environnements. Une étude récente réalisée sur le sédiment profond dans l'est de la mer Méditerranée, a montré que les *Acidobacteria* et les *Actinobacter* étaient les groupes taxonomiques dominants. Ceci différencie les sédiments de cette région de la plupart des sédiments oxiques et primitifs. En revanche les membres des groupes tels que *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Verrucomicrobia*, *Nitrospirae*, *Beta-proteobacteria*, *Lentisphaerae* et les *Dictyoglomi* sont en général très peu représentés (Polymenakou *et al.*, 2009).

Les sédiments estuariens comptent les mêmes groupes bactériens que ceux que l'on retrouve dans les sédiments marins. Néanmoins, ce sont les espèces à l'intérieur de ces groupes qui varient. Par exemple, une étude récente dans les sédiments anoxiques de l'île Sapelo en Georgie a montré que les *Gamma-Proteobacteria* constituaient le quart de la population présente dans les sédiments (Lasher *et al.*, 2009). D'autres groupes tels les *Delta-Proteobacteria*, les *Bacteroidetes* et les *Cyanobacteria* sont aussi retrouvés. Ces groupes sont aussi abondants dans d'autres sédiments côtiers (Asami *et al.*, 2005; Cifuentes *et al.*, 2000; Gray & Herwig, 1996; Kim *et al.*, 2004) Si on retrouve ces groupes dans d'autres sédiments côtiers, les espèces, elles, varient en fonction de différents paramètres spécifiques à chaque environnement. Dans l'ensemble, toutes les études montrent que les sédiments marins hébergent une grande diversité d'espèces bactériennes (Gray & Herwig, 1996; Sass *et al.*, 1998).

III.2. Les types de bactéries selon leur métabolisme

Les hétérotrophes aérobies

Il existe un nombre important de bactéries capables de dégrader la matière organique en présence de l'oxygène. Néanmoins une partie d'entre elles sont des bactéries anaérobies facultatives, c'est-à-dire qu'elles disposent d'alternatives en cas d'absence d'oxygène. Ainsi, on retrouve dans le sédiment les bactéries du genre *Vibrio*, aérobie/anaérobies facultatives. Certaines espèces des genres *Pseudomonas* ou *Bacillus* longtemps considérés comme uniquement composés de bactéries aérobies, sont capables d'utiliser les nitrates comme accepteur final d'électrons sous conditions anoxiques.

Les chimiolithotrophes

Ces bactéries utilisent des composés inorganiques comme source d'énergie. A part les bactéries qui utilisent le dihydrogène comme source d'énergie, les bactéries chimiolithotrophes sont très peu répandues dans les sédiments côtiers. Plusieurs groupes bactériens sont capables d'utiliser

Données bibliographiques : Le sédiment

l'hydrogène comme source d'énergie : les aérobies telles que *Alcaligenes eutrophus*, des anaérobies facultatives comme *Shewanella putrefaciens*, *Paracoccus denitrificans* et des anaérobies strictes comme les bactéries sulfato-réductrices et les méthanogènes. Certaines de ces bactéries sont des autotrophes et utilisent le dioxyde de carbone comme seule source de carbone tandis que d'autres comme *S. putrefaciens* sont des hétérotrophes utilisant comme source d'énergie l'hydrogène.

Les bactéries oxydant le soufre

Se sont des bactéries que l'on retrouve souvent dans des sédiments anoxiques ou dans l'eau juste à l'interface eau-sédiment dans des environnements où il existe très peu de brassages de l'eau. En effet, la plupart des bactéries oxydant le soufre utilisent les thiosulfates ou le soufre élémentaire mais principalement les sulfures. Or l'on sait qu'au contact de l'oxygène, les sulfures sont très rapidement oxydés comme c'est le cas souvent à l'interface eau-sédiment. Ces bactéries sont composées des acidophiles et des bactéries des pH neutres. Les acidophiles utilisent les sulfures comme source d'énergie et les convertissent en acide sulfurique qui donne des pH acides. Celles qui sont adaptées aux environnements à pH neutre sont souvent retrouvées dans les sédiments marins ou d'eaux douces. On y trouve entre autres les bactéries des genres *Thiobacillus*, *Beggiatoa*, *Thioploca*, *Thiothrix*, très difficiles à cultiver.

Les bactéries qui oxydent le fer

Dans les environnements à pH neutre, l'oxydation de l'ion ferreux en ion ferrique est extrêmement rapide et la compétition très difficile pour les bactéries oxydant le fer. Dans ces environnements ainsi que dans les minerais acides, les espèces comme *Thiobacillus ferrooxidans* se développe en utilisant l'ion ferreux comme seule source d'énergie.

Les bactéries nitrifiantes et méthanotrophes

Les bactéries nitrifiantes sont constituées de deux groupes métaboliques. Les premiers, les bactéries ammonifiantes oxydent l'ammonium en nitrites. Ce groupe est composé d'espèces des genres *Nitrosobacter*, *Nitrosococcus* et *Nitrosomonas*. Le deuxième groupe est composé des bactéries des genres *Nitrobacter*, *Nitrococcus* et *Nitrospira*. Ces bactéries oxydent en nitrates les nitrites issus de l'oxydation de l'ammonium. Les bactéries ammonifiantes partagent le même habitat que les méthanotrophes et sont abondantes au niveau de l'interface oxiq-anoxique du sédiment. Ce sont des bactéries qui utilisent le méthane comme seule source de carbone et d'énergie et regroupent des espèces des genres *Methylomonas*, *Methylococcus* et *Methylosinus*. Les méthylothropes quant à

eux, utilisent le méthanol comme source de carbone mais sont capable de pousser sur d'autres composés carbonés.

Les bactéries qui réduisent les nitrates

Il existe deux voies de réduction des nitrates : la RDNA et la dénitrification. Dans la dénitrification, les nitrates sont réduits par de nombreuses bactéries en azote minéral N_2 dans les processus de dénitrification. Ces bactéries sont ubiquitaires et jouent un rôle dans les cycles du carbone et de l'azote dans les sédiments. Dans ces environnements, les nitrates sont les accepteurs d'électrons utilisés lorsque la concentration en oxygène devient limitante. Néanmoins, il existe des bactéries capables de réduire les nitrates en présence de l'oxygène ou lorsque le rapport O_2/NO_3 est élevé comme dans la voie de la RDNA (pour Réduction Dissimilatrice de Nitrate en Ammonium) (Robertson & Kuenen, 1988). C'est une voie d'électron-dump pour métabolisme fermentative. Elle permet un gain en ATP lorsque les produits sont plus oxydés (comme l'acétate). Néanmoins, dans la RDNA, la réaction n'est pas directement couplée à la chaîne respiratoire comme dans la dénitrification.

Les bactéries sulfato-réductrices

Dans le groupe des bactéries réductrices du soufre on note les bactéries anaérobies facultatives comme *Shewanella putrefaciens* (Moser & Nealson, 1996), les anaérobies strictes tels que *Wollinella*, *Desulfuromonas*. Les sulfato-réducteurs sont composés de bactéries anaérobies strictes parmi lesquelles on trouve les genres tels que *Desulfobacter*, *Desulfovibrio* etc...

Méthanogènes et Acétogènes

Les bactéries méthanogènes font partie du domaine des Archae. La production du méthane est spécifique de ces bactéries et ces dernières sont très répandues dans des environnements anoxiques et thermophiliques. Ces bactéries qui font parties des genres *Methanobacter*, *Methanococcus*, *Methanobacterium*, pour ne citer que celles-là, utilisent le CO_2 et l'hydrogène comme substrat pour former du méthane alors que d'autres utilisent l'acétate.

Les acétogènes forment un groupe hétérogène de bactéries capables de réduire deux molécules de CO_2 en acétate en utilisant l'hydrogène comme réducteur pour certains ou d'autres substrat pour d'autres. Ce groupe est composé de bactéries de divers genres tels que *Clostridium*, *Acetobacterium*, *Acetogenium* qui sont très répandues dans les sédiments.

IV. Méthodes d'analyses en microbiologie du sédiment :

Cette partie présente un condensé des différentes méthodes dans l'étude des bactéries de manière générale et dans le sédiment de façon plus spécifique. La figure 18 présente les différentes échelles d'études de la bactérie, qui peuvent aller de l'étude de l'acide nucléique à l'étude de la morphologie de la bactérie. Le sédiment prélevé dans l'environnement subit divers traitements (sous-échantillonnage, homogénéisation) suivant le but recherché et la méthode choisie. Les différentes méthodes listées dans la figure 18 ne sont pas exhaustives mais constituent dans l'ensemble, des méthodes courantes de caractérisation de la biomasse, de l'activité et de la diversité bactérienne dans un milieu donné.

Données bibliographiques : Le sédiment

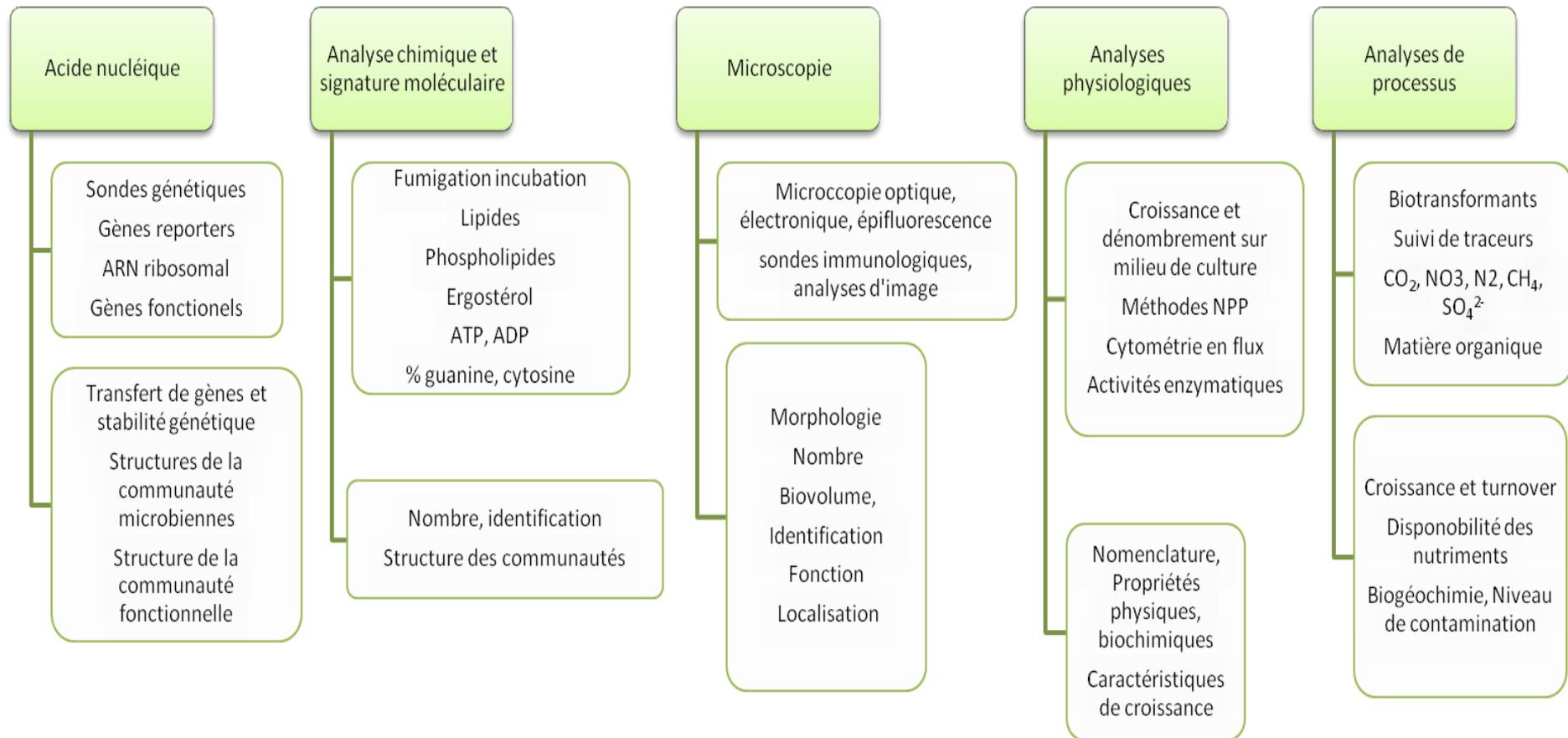


Figure18 : Méthodes d'analyse des bactéries du sédiment (Neto, 2007)

Les méthodes d'analyses de bactéries du sédiment ne diffèrent pas de celles utilisées pour l'analyse des *Vibrio* dans l'environnement, excepté la culture puisqu'un grand nombre n'a pas encore été cultivé et certaines nécessitent des conditions d'anaérobiose.

IV.1. Le dénombrement

Il existe de nombreuses études de dénombrement des bactéries plus ou moins adaptées aux bactéries de l'environnement. La difficulté réside dans le fait qu'il existe une interférence des particules qui compliquent la mise en place de ces méthodes sur les milieux complexes tels que les sédiments ou les sols.

Estimation totale de la biomasse bactérienne

Des méthodes adaptées sont disponibles pour l'énumération des bactéries du sédiment à savoir les méthodes de comptage direct basées sur l'utilisation de fluorochromes et de la microscopie à épifluorescence, la méthode d'hybridation in situ ou FISH ou encore la cytométrie en flux. La microscopie à épifluorescence est utilisée depuis les années 70 et est basée sur le complexe fluorochrome/acide nucléique qui est excitée en lumière de courte longueur d'onde et réémet une lumière visible (Rebillard & Torre, 1993). Les fluorochromes pénètrent passivement la cellule, ce qui permet leur utilisation sur des échantillons fixés au formol. Cette technique a l'avantage d'être simple et peu onéreuse. Néanmoins, elle reste fastidieuse à appliquer aux milieux complexes comme les sols ou les sédiments dans lesquels se trouvent des particules autofluorescentes. En effet, pour limiter l'interférence des particules, il est nécessaire de diluer fortement l'échantillon, ce qui peut limiter le dénombrement pour des échantillons peu colonisés. Trois fluorochromes sont souvent utilisés : le DAPI (4'-6-diamino-2-phénylindole dihydrochlorure), l'acridine orange (3,6-tétraméthyl-diamino acridine) et le Bac light (SYTO 9 et propidium iodide).

Il existe dans la littérature de nombreuses études utilisant ces différentes techniques pour le dénombrement des bactéries avec néanmoins des variations suivant les auteurs. En effet, afin de dissocier les bactéries des particules du sédiment ou du sol, certaines études appliquent la sonication sur les échantillons (Bianchi & Giuliano, 1996), d'autres utilisent des surfactants et certains couplent la sonication avec les surfactants tels que du pyrophosphate de sodium (Kuwae & Hosokawa, 1999; Yoon & Rosson, 1990). Néanmoins, certains pensent que l'utilisation de ces différentes méthodes est susceptible d'éclater les cellules. Pour finir, même en utilisant ces différents moyens, le détachement des cellules des particules n'est pas complet et les résultats sont souvent sous estimés. Des études réalisées sur le sol et sur certains sédiments utilisent une méthode basée sur l'extraction des bactéries

Données bibliographiques : Le sédiment

par gradient de densité avec le Nycodenz avant d'appliquer les fluorochromes (Courtois *et al.*, 2001). Toutefois, cette méthode nécessite l'ultracentrifugation qui n'est pas toujours accessible et ne résout pas le problème du détachement des cellules des particules.

Une autre méthode utilisant la fluorescence est le FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). Cette méthode est basée sur l'utilisation d'une sonde fluorescente d'acide nucléique. L'avantage de cette méthode permet de cibler spécifiquement grâce aux sondes des bactéries, un groupe de bactéries donné ou une espèce donnée. Toutefois, elle reste aussi soumise à la difficulté liée à l'attachement des bactéries aux particules du sédiment mais permet de les visualiser.

Estimation des bactéries cultivables -dénombrement sur boîte de pétri

La méthode est basée sur le postulat qu'une cellule bactérienne présente dans un milieu donné, génère une colonie unique et isolée lorsque l'échantillon est inoculé sur un milieu adéquat. A cet effet, des dilutions sont réalisées dans de l'eau de mer stérile et 100 µl de chaque dilution sont étalés sur le milieu. La durée et la température d'incubation respectent l'optimum de croissance de la majorité des espèces. Ne sont pris en compte que les boîtes comptant entre 30 et 300 colonies. Les résultats sont exprimés en CFU par gramme de sédiment sec ou humide.

Estimations de membres spécifiques

Le milieu de culture Zobell 2216E agar ou Bacto Marine Agar 2216 (MA, Difco 0979) est le plus couramment utilisé et le mieux adapté pour l'isolement et la quantification des bactéries hétérotrophes du sédiment. Certaines bactéries nécessitent un ajout supplémentaire de sodium alginate à 0.5 % (Sawabe *et al.*, 1995).

Il existe aussi des milieux sélectifs pour la quantification des bactéries d'une espèce donnée ou un genre donné. Par exemple, le milieu de culture TCBS agar permet l'isolation sélective et le dénombrement des espèces de genre *Vibrio* provenant de divers milieux. Cependant, toutes les bactéries de ce genre n'y poussent pas, notamment certaines souches de l'espèce *V. aestuarianus*. Un milieu équivalent le Chromagar *Vibrio* qui laisse pousser *V. aestuarianus* a été par la suite utilisé. A cet effet, des méthodes moléculaires comme l'hybridation sur colonies permet de cibler une espèce ou un groupe de bactéries données.

Une autre technique basée sur la mise en culture préalable des cellules de l'échantillon à analyser est la méthode du « Nombre le plus Probable ». Des milieux spécifiques sont adaptés pour l'énumération de certaines espèces de *Vibrio*. Néanmoins, il s'avère que ces techniques soient limitées pour l'énumération des bactéries de sols et de sédiments (Boenigk, 2004) car elles ne prennent pas en compte les bactéries viables mais non cultivables. Pour de nombreux auteurs, ces

bactéries viables non cultivables représentent 97 à 99 % de la population totale. De plus, les résultats de dénombrement à partir de méthodes de culture peuvent varier selon la température, le pH, la nature du milieu de culture. Très récemment, la PCR quantitative a été appliquée pour l'énumération des bactéries dans le sédiment.

Le colony-blot ou l'hybridation sur colonie

La technique d'hybridation sur colonies consiste en la mise en culture préalable sur milieu gélosé (Marine agar) de l'échantillon à analyser. Les colonies sont ensuite transférées sur une membrane de nylon ou du papier filtre. Les membranes bactériennes sont ensuite dénaturées, ce qui permet l'éclatement des cellules et la sortie de l'ADN. Ce dernier est alors fixé à la membrane soit au moyen de la lumière U.V soit à la chaleur (80 °C) pendant une durée de quelques minutes. Une sonde d'ADN spécifique du gène et de l'espèce bactérienne donnée et possédant un marquage enzymatique ou radioactif est alors appliqué pour hybridation sur l'échantillon. Chaque signal sur la membrane ou le filtre est considéré comme positif après révélation.

Cette méthode est couramment utilisée dans le diagnostic et l'analyse des bactéries pathogènes dans les aliments. Elle a été introduite par Moseley *et al.*, (1980) dans la recherche et la détection de l'entérotoxine ETEC d'*Escherichia coli* à partir d'échantillons d'excréments humains. Cette méthode possède une forte efficacité lorsque des sondes radio-marquées sont utilisées (Datta *et al.*, 1988; Jagow & Hill, 1986) Cependant, il est plus difficile à appliquer directement à des échantillons complexes comme le sédiment ou le sol. En effet les signaux sont moins prononcés quand des sondes non radioactives sont utilisées et la limite de détection est insuffisante. Des dilutions ou une culture sur un milieu sélectif avant l'hybridation sont alors nécessaires pour y remédier. Divers laboratoires ont développé des sondes moléculaires pour la détection des bactéries du genre *Vibrio* mais celles-ci ne n'ont été appliquées pour l'instant qu'à des échantillons relatifs à la santé publique telle que les mollusques ou l'eau de mer (Tableau 3). Très peu ont été utilisés dans les sédiments ou le sol.

Les sondes peuvent cibler divers types de gènes comme par exemple, les gènes de la cytolysine ou de l'hémolysine chez *V. vulnificus* (Cerda-Cuellar *et al.*, 2000; Mahmud *et al.*, 2006; Parvathi *et al.*, 2004), le gène de la toxine du cholera (Wright *et al.*, 1992) ou le gène de l'ARN ribosomique 16 S (Cerda-Cuellar *et al.*, 2000; Grimes *et al.*, 2009). Le gène de la gyrase B a été utilisé dans la détection et la quantification spécifique des bactéries du genre *Vibrio* dans l'ensemble (Raghunath & Karunasagar, 2007). Dans notre étude de l'écologie de *V. aestuarianus*, nous avons utilisé ce gène pour la synthèse d'une sonde spécifique pour la détection et la quantification de cette bactérie dans le sédiment et les huîtres (détails dans le chapitre 1 de ce manuscrit).

Données bibliographiques : Le sédiment

Tableau 3 : Quelques exemples de sondes oligonucléotides pour la détection de bactéries (Pour les séquences, se référer aux références indiquées)

Bactérie	Origine de la sonde	Référence
<i>Listeria monocytogenes</i>	Gène impliqué dans l'invasion	(Taylor & Hiratsuka, 1990)
<i>Vibrio vulnificus</i>	Gène de la cytolysine (<i>hlyA</i>)	(Wright <i>et al.</i> , 1993)
	Gène de la cytolysine (<i>vvhA</i>)	(Parvathi <i>et al.</i> , 2004)
	Gène de l'ARNr 16S	(Cerda-Cuellar <i>et al.</i> , 2000)
<i>V. parahaemolyticus</i>	Gène de l'Hémolysine thermostable (<i>trh</i>)	(Nordstrom <i>et al.</i> , 2006; Raghunath <i>et al.</i> , 2007)
	Gène de l'Hémolysine thermolabile (<i>tlh</i>)	(Deepanjali <i>et al.</i> , 2005)
<i>V. cholerae</i>	Espace intergénique 16S-23S	(Jiang & Fu, 2001)
	Gène de la toxine cholérique	(Yoh <i>et al.</i> , 1993)
	Gène de la luciférase	
<i>V. proteolyticus</i>	Gène de l'ARNr 16S	(MuniesaPerez <i>et al.</i> , 1996)
<i>V. anguillarum et V. ordalii</i>	Gène de l'ARNr 5S	(Ito <i>et al.</i> , 1995)

En conclusion, il existe de nombreuses méthodes de dénombrement des bactéries de l'environnement. Bien que les méthodes culturales ne prennent en compte qu'une faible partie de la population totale, elles restent de loin le seul moyen permettant d'isoler une souche pour des caractérisations ultérieures. De fait, nous avons choisi cette méthode pour notre étude.

Comme, signalé précédemment, une autre façon d'étudier une population bactérienne est l'étude des activités métaboliques. Cet aspect n'a pas été abordé dans notre étude. De ce fait, nous n'en parlerons que brièvement par un petit rappel.

IV.2. Les activités bactériennes

Les mesures d'activités globales communes à la plupart des bactéries renseignent sur l'état de santé et le fonctionnement d'un écosystème. Les enzymes telles que la catalase, la déshydrogénase, la peroxydase ou les hydrolases peuvent être mesurées. Une étude menée sur un sol a montré que les mesures de certaines de ces enzymes étaient corrélées à la quantité de carbone organique (Kizilkaya *et al.*, 2004). On pense que cette corrélation peut être le fruit, d'une forte dégradabilité de la matière organique, de la possibilité des bactéries à dégrader la matière organique ou alors un stress du à l'appauvrissement du milieu en carbone organique. Cependant, la plupart de ces enzymes sont extracellulaires et peuvent rester actives même à l'extérieur de la cellule. De ce fait, la mesure de leur

activité dans le sédiment n'est pas le reflet de la population active. Une manière de mesurer l'état physiologique d'un sédiment est de s'intéresser à une population fonctionnelle donnée telles que les bactéries dénitrifiantes qui participent au cycle de l'azote et du carbone. La plupart des dénitrifiants sont des bactéries anaérobies facultatives et obligatoires qui utilisent les nitrates comme accepteur final d'électrons en l'absence de l'oxygène (Van Rijn *et al.*, 2006). Lorsque la dénitrification est hétérotrophe, une carence en carbone organique dans le sédiment peut résulter en une accumulation des produits intermédiaires tels que le NO_2 et le N_2O alors qu'un excès de carbone provoque une réduction du NO_3 en ammoniac par la voie dissimilatrice (RDNA). La dénitrification autotrophe quant à elle se fait sous faible ratio C/N.

Du fait que la plupart des bactéries du sédiment sont des hétérotrophes et parce que les biodépôts des huîtres dans les sites ostréicoles sont sensés induire un excès en carbone dans les sédiments, nous avons considéré la mesure de l'ammoniac comme reflet de la réduction dissimilatrice du nitrate ou de la RDNA.

IV.3. L'étude de la diversité bactérienne

L'un des plus grands enjeux en écologie microbienne est de déterminer la diversité des populations bactériennes d'un habitat donné. Le concept de diversité bactérienne comporte deux notions, la richesse spécifique d'un écosystème donné et la structure des espèces de cet écosystème. Pouvoir estimer la diversité des communautés microbiennes (en termes de richesse et de structure) est un moyen pour suivre leur évolution dans leur environnement. De manière beaucoup plus générale, cela permet de répondre à la question de la modulation des communautés microbiennes par les facteurs environnementaux.

Les analyses de la diversité bactériennes ont d'abord été réalisées grâce à l'amplification, le clonage et le séquençage de fragments de gènes spécifiques. Les macromolécules phylogénétiques, en particulier le gène codant l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S) directement amplifié à partir d'ADN issu du sédiment sont largement utilisées à cet effet. Cependant elles sont onéreuses et limitées sur le plan pratique. Ceci a conduit au développement de méthodes alternatives. La plupart de ces méthodes consistent à séparer des séquences amplifiées par PCR à partir d'ADN d'une communauté bactérienne (sol, sédiment par exemple) par électrophorèse en gradient dénaturant ou par colonne capillaire. Le tableau 4 résume les méthodes dites d'empreintes génétiques et qui sont largement utilisées en écologie microbienne. Elles permettent l'analyse simultanée de plusieurs échantillons. Néanmoins, certaines possèdent plus d'inconvénients que d'autres. Pour notre étude, nous avons choisi la méthode de la DGGE car elle était plus appropriée et en plus d'être moins onéreuse mais surtout elle permet l'identification des bandes après séquençage.

Données bibliographiques : Le sédiment

Tableau 4 : Caractéristiques des techniques de biologie moléculaire couramment utilisées en écologie microbienne pour l'étude de la diversité bactérienne d'un environnement.

Méthodes	Principe	Avantages	Inconvénients	Références
DGGE/TGGE	Des fragments d'ADN ayant presque la même longueur mais qui diffèrent ne serait-ce que par un nucléotide peuvent être séparés par électrophorèse sur un gradient dénaturant chimique (DGGE) ou thermique (TGGE) et la séparation est fonction de la température de fusion de chaque fragment.	<ul style="list-style-type: none"> - Etude de la structure de la communauté bactérienne d'un environnement donné. - Elle peut être semi-quantitative. - Selon le besoin, des bandes peuvent être séquencées pour identification taxonomique. - Plusieurs échantillons peuvent être comparés 	<ul style="list-style-type: none"> - Cette méthode une mise point préalable (pour tout nouveau gène) qui se situe aux trois niveaux, c'est-à-dire, mise au point de l'extraction d'ADN ou ARN, de la PCR mais aussi du gradient de dénaturation. - Co-migration de plusieurs bandes qui entraîne une sous-estimation de la diversité. - Formation de bandes chimériques qui induisent une surestimation de la diversité. - La taille de fragment à amplifier est limitée. 	<p>Muyzer <i>et al.</i>, 1993</p> <p>(Muyzer & Smalla, 1998)</p>
ARISA/RISA (Ribosomal intergenic spacer analysis)	Cette méthode est basée sur l'analyse du polymorphisme de l'espace intergénique en les sous-unités 16S et 23S de l'ARNr. Les fragments amplifiés sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose.	C'est une méthode automatique qui ne nécessite pas une mise au point préalable.	Cette méthode ne renseigne pas sur la richesse spécifique et ne permet pas l'identification des espèces présentes.	(Fisher & Triplett, 1999)
(T)-RFLP (Terminal-Restriction fragment length polymorphism)	Digestion de fragments d'ADN double-brin par des enzymes de restriction et séparation par électrophorèse en gel	-Détection d'espèces rares d'une communauté.	- Formation de pseudo-fragment de restriction (T-RFLP).	(Dollhopf <i>et al.</i> , 2001)

Données bibliographiques : Le sédiment

	d'agarose ou d'acrylamide.	- Méthode semi-quantitative (T-RFLP). -Méthode reproductible.	-Ne convient pas pour des communautés complexes comme le sédiment par exemple.
SSCP (Single strand conformation polymorphism)	Séparation de fragments d'ADN simple-brin sur gel d'acrylamide ou par électrophorèse sur capillaire. Cette méthode est basée sur le principe que les ADN simple-brin possèdent une conformation tridimensionnelle déterminée par les interactions intramoléculaires qui affecte la mobilité électrophorétique à faible température.	- Bonne résolution - La séparation par capillaire permet l'identification par comparaison des pics obtenus à des pics d'espèces connues. -Méthode reproductible	- La taille du fragment à amplifier et à séparer est limitée. Elle doit être courte pour une bonne résolution. -Co-migration de plusieurs bandes

La PCR-DGGE

La PCR-DGGE a pour principe l'étude du polymorphisme d'un gène donné qui est amplifié par PCR. L'amplification génère des fragments de même taille mais de séquences différentes selon l'organisme cible. Les différents fragments sont ensuite séparés par électrophorèse sur un gel contenant un gradient de dénaturation chimique tels que l'urée et le formamide (Muyzer *et al.*, 1993). Lorsqu'une molécule d'ADN double brin chargée négativement est soumise à un gradient de dénaturation croissant, elle migre dans le gel jusqu'à ce que l'action du dénaturant provoque sa dissociation en simple brin. La dénaturation de la molécule est dépendante de sa richesse en bases AT et en bases GC. En effet, les liaisons covalentes entre les bases CG sont plus fortes que les liaisons entre les bases AT. Les molécules d'ADN doubles brins vont donc se séparer en des temps de migration différents en fonction de leur Tm et de leur séquence. La séparation a lieu en premier dans les zones de faibles liaisons (bases AT), il y aura une dénaturation partielle. La molécule la plus stable (riche en GC) migrera plus longtemps alors qu'une molécule riche en AT se dénaturera plus vite. Le passage de la molécule double brin en simple brin provoque un changement de conformation (si les deux brins sont reliés par une queue riche en CG) qui rend la molécule plus encombrante et la freine. Pour empêcher la séparation complète des brins, une queue GC à Tm élevé ou GC-clamp

Données bibliographiques : Le sédiment

(habituellement de 40 bp) est rajoutée à l'une des amorces et fait donc partie des brins amplifiés. On obtient au final sur le gel un profil de bandes qui est une représentation génétique de la communauté bactérienne.

Les limites de cette méthode sont liées à plusieurs aspects. Lors de l'électrophorèse, des fragments d'ADN de séquences différentes peuvent migrer ensemble, ce qui limite la sensibilité de la méthode (Dorigo *et al.*, 2005; Ranjard *et al.*, 2000). Une espèce peut être représentée par plusieurs bandes du fait qu'il peut avoir plusieurs copies du gène de l'ARN 16S (Ranjard *et al.*, 2000). Par ailleurs, une espèce présente dans un milieu peut ne pas être détectée et des bandes ne correspondant à aucune espèce mais plutôt à des hétéroduplexes ou des chimères formés par les amorces peuvent être observées. Les inconvénients résident aussi dans la difficulté de comparer des échantillons de gels différents ou dans la difficulté de séparer des produits PCR dont la taille est supérieure à 500 bp. L'information phylogénétique obtenue à partir de petites séquences est donc limitée. Néanmoins, certains de ces inconvénients peuvent être contournés. Actuellement il existe sur le marché, des appareils d'électrophorèse qui permettent de faire migrer jusqu'à 30 échantillons différents. Les problèmes d'hétéroduplexes ou de formation de doubles bandes peuvent être résolus si la PCR est réalisée dans des conditions très stringentes. Pour finir, la PCR-DGGE contrairement à d'autres techniques telles que le clonage-séquençage permet d'étudier un grand nombre d'échantillons. De plus, la possibilité d'exciser, cloner et séquencer les bandes intéressantes est un autre avantage. La PCR-DGGE, reste un bon outil pour comparer des échantillons entre eux dans le but d'évaluer l'impact d'un traitement par exemple. La figure 19 présente les différentes étapes de la DGGE.

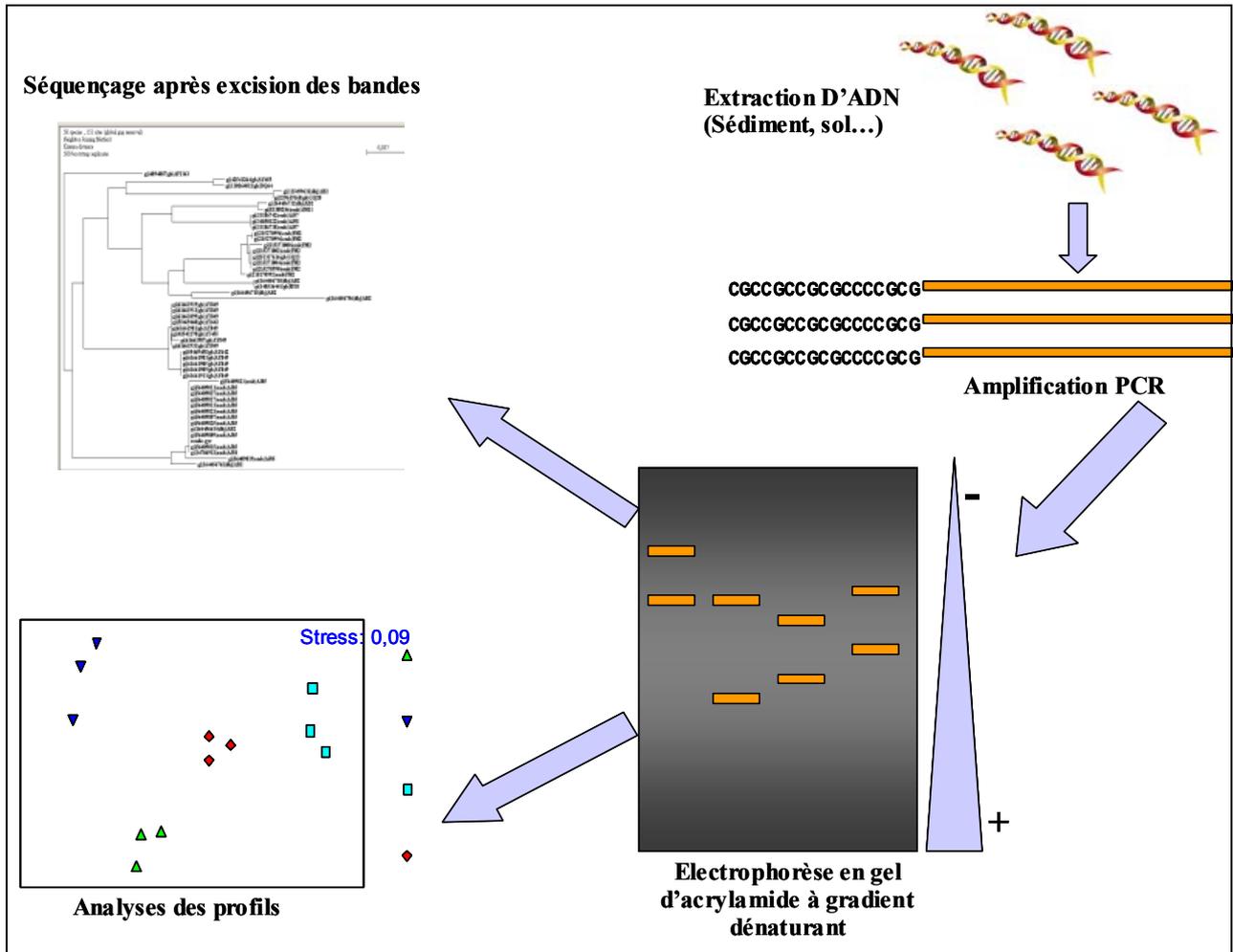


Figure 19: Récapitulatif des différentes étapes dans la DGGE et les différentes analyses.

Deuxième Partie :

Résultats



**Chapitre 1 : Sites d'étude,
échantillonnage et caractéristiques
physico-chimiques**

Chapitre 1 : Sites d'études, échantillonnage et caractéristiques physico-chimiques

Introduction

Les analyses réalisées dans le bassin de Marennes Oléron au cours du programme Morest ont montré que l'élevage à proximité du sédiment pouvait être à l'origine d'un stress aigu pour les huîtres et être impliqué dans l'apparition de mortalités massives (Samain & McCombie, 2008). Ce stress sédimentaire est sans doute lié à l'accumulation et à la dégradation de la matière organique dans les zones estuariennes où se concentrent les activités ostréicoles. Les estuaires sont généralement définis comme des zones de transition provenant de la rencontre des eaux continentales et marines. Ces zones présentent des variations qui sont observées au niveau de variables physico-chimiques comme la salinité, le pH, la température, la matière organique particulaire ou dissoute, entre autres. Les marées et le débit fluvial ont une grande influence sur l'apport ou l'exportation des matières en suspension ou dissoutes dans les estuaires.

Les activités aquacoles sont connues pour être à l'origine de l'eutrophisation des estuaires par l'augmentation de la concentration en biodépôts (fèces et pseudofèces des bivalves) et de la matière organique dissoute (Baudinet *et al.*, 1990; Deslous-Paoli *et al.*, 1996; Forrest *et al.*, 2009; Mazouni *et al.*, 1996a; Mazouni *et al.*, 1996b). La dégradation de la matière organique sédimentée est consommatrice d'oxygène. Sous l'effet de la température et de la demande en oxygène des hétérotrophes (bactéries et animaux), une hypoxie voire une anoxie peut se produire par manque de brassage des masses d'eau (Gray *et al.*, 2002).

L'hypoxie bien que fréquente dans les eaux, est beaucoup plus élevée au niveau de l'interface eau – sédiment (Diaz & Rosenberg, 1995) et favorise la production de substances toxiques comme l'ammoniaque et les sulfures (Gray *et al.* 2002). Ces substances sont nocives pour les huîtres et leur augmentation après les périodes de bloom phytoplanctonique généralement en mai, juin pourrait entraîner un stress physiologique et coïncide avec les mortalités.

Cette partie de l'étude avait pour principal objectif la caractérisation de l'environnement physico-chimique des sédiments des sites d'études. Par ailleurs, les bactéries étant les premiers opérateurs dans la minéralisation de la matière organique, cette caractérisation a entre autre pour objectif de déterminer l'intensité de la minéralisation pour l'étude des relations entre certains paramètres physico-chimiques et la structure des communautés bactériennes (chapitre 2).

Dans cette partie, pour chaque site d'étude, les variations saisonnières des paramètres indicateurs de l'enrichissement en matière organique et des processus de minéralisation (carbone et azote organique, chlorophylle a, phosphate, ammonium, sulfures) ont été évaluées. Les paramètres physiques comme la température de l'eau, la salinité, le pH et la granulométrie ont aussi été étudiés. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe de chimie des sédiments du laboratoire

Chapitre 1 : Sites d'études, échantillonnage et caractéristiques physico-chimiques

DYNECO-Pélagos de l'Ifremer (Françoise Andrieux-Loyer, Roger Kérouel, Xavier Philippon, Agnès Youenou) et est à l'origine de deux articles en cours de rédaction.

I. Les sites d'études

I.1. La rivière d'Auray

La « rivière » d'Auray (appellation locale pour une ria marine) représente la partie ouest du Golfe du Morbihan. Ce Golfe est un plan d'eau d'une surface de 115 km², d'une profondeur moyenne de 4,4 m et d'un volume de 510 millions de m³, parsemée d'îlots et ouvert sur l'océan par un goulet de 900 m de large. La rivière d'Auray représente, elle, 11,75 millions de m³. Le marnage y est compris entre 4,5 m en amont et 5 m en aval. Les mouvements de marée occasionnent un renouvellement de 50% de l'eau du Golfe en 10 jours (20 marées). L'exposition aux influences terrigènes se fait au travers de bassins versants de surface modérée (800 km²), dont les deux principaux débouchent en rivière d'Auray : le Loch (232 km²) et le Sal (94 km²). Les larges surfaces intertidales (1/3 de la surface totale) ont permis à l'élevage de l'huître plate puis de l'huître creuse de se développer, d'abord au sol puis de plus en plus en surélévation avec l'apparition récente des tables ostréicoles. Un total de 4500 tonnes d'huîtres est produit annuellement sur une surface concédée de 1635 ha. La rivière d'Auray est consacrée principalement au « demi-élevage » (huîtres entre 6-9 mois et 18-21 mois). C'est la partie du Golfe du Morbihan où les professionnels signalent le plus de mortalités de naissains, notamment depuis une dizaine d'années. La figure 20 présente la rivière d'Auray ainsi que le site ostréicole du Fort-Espagnol où les prélèvements ont été effectués.



Figure 20 : Représentation du site ostréicole du Fort-Espagnol et de la rivière d'Auray situés dans la partie sud du golfe du Morbihan.

1.2 Le site de l'aber Benoît

C'est une rivière du pays de Léon qui se situe au Nord-Ouest du Finistère entre l'aber-Wrac'h et l'aber-Ildut et est ouverte sur l'océan. L'aber Benoît est principalement formé par la confluence de deux rivières, l'aber Benoît et l'aber Benouïc. L'estuaire, long de 9 km et large de 600 m draine un bassin versant de 240 km² et reçoit un réseau très dense de ruisseaux. Il est bordé de banquettes vaseuses en amont alors que les sédiments sont plutôt sableux en aval. L'estuaire se vide totalement en amont et partiellement en aval à chaque marée. Les domaines de salinité limnique et oligohalin ne

Chapitre 1 : Sites d'études, échantillonnage et caractéristiques physico-chimiques

sont pas représentés et la turbidité y est faible. Le débit moyen annuel en eau est d'environ 0,418 m³/s. La grande partie de l'aber est un bassin long de 12 km pour une superficie de 14 km² dont la salinité descend rarement en dessous de 32. La conchyliculture qui est l'un des principaux usages de l'estuaire occupe la partie aval et centrale sur une surface de 38 hectares. Le pays des Abers, dans son ensemble, produit environ 1500 tonnes d'huîtres creuses chaque année. Les huîtres sont élevées à partir des naissains pendant 3 à 4 ans dans les eaux saumâtres des Abers « sur tables » ou à « à plats ». C'est une zone propice à l'élevage des huîtres grâce à la présence d'intense production primaire de microalgues qui servent de fourrage aux bivalves. Jusqu'aux épisodes récents de mortalités estivales (2008-2009) cette zone n'était pas touchée, la température de l'eau restant inférieure à 19 °C. Nous l'avons par conséquent choisie comme site de référence. La figure 21 présente les sites de l'aber Benoît ainsi que la ferme ostréicole de Vivier de Beg ar vil où les prélèvements ont été effectués.

Chapitre 1 : Sites d'études, échantillonnage et caractéristiques physico-chimiques



Figure 21 : Représentation du site ostréicole de Vivier de Beg ar vil et de l'Aber-Benoît situé au nord-ouest du finistère

Chapitre 1 : Sites d'études, échantillonnage et caractéristiques physico-chimiques

I.3 Les échantillonnages

Le travail de terrain a été réalisé sur une période de deux années, de juin à septembre 2007 et en février, mars, mai et juin 2008. La première année, cette période d'étude a été choisie car plus propice aux fortes températures et susceptible de voir se produire des mortalités. Les mois de février et mars permettent d'observer la transition entre l'hiver et le printemps et le mois de mai pour l'étude des caractéristiques printanières. Nous disposons d'huîtres d'environ 12 mois qui sont issues de familles résistante et sensible et des lots de témoin de captage. Les huîtres de chacune des différentes familles sont disposées pour chacune d'elles dans deux poches. Une poche contient 100 huîtres pour les comptages des mortalités et l'autre poche plus de 200 huîtres pour effectuer les prélèvements d'hémolymphe. Les poches sont disposées sur des tables de 50 cm de hauteur par rapport au sédiment.

I.3.2 Prélèvement et traitement des sédiments

Dans le but de déterminer l'effet de l'apport de la matière organique par les huîtres sur la composition et l'abondance des bactéries ainsi que sur les caractéristiques physico-chimiques du sédiment, les échantillons de sédiment sont prélevés sous les tables d'huîtres (site sous table) et à 30 mètres des tables (site témoin hors table). Sur chaque site, nous avons disposé des repères afin de prélever aux mêmes endroits à chaque date au niveau du site témoin. Les tables d'huîtres ont servi de repères pour les prélèvements sous tables.

Echantillons destinés aux analyses physico-chimiques

Pour les analyses physico-chimiques, les sédiments ont été prélevés avec l'eau surnageante à l'aide de tubes PVC ($\varnothing = 9$ cm, $L = 30$ cm). Pendant les campagnes 2007, 3 répliquats de sédiment ont été prélevés sous les tables et 3 autres en dehors des tables. Ensuite pour améliorer les traitements statistiques, 4 répliquats ont été prélevés sur les deux stations pendant les campagnes de 2008. Notons que les échantillonnages concernant les caractéristiques physico-chimiques n'ont pas pu être réalisés pendant le mois de février.

Une partie des mesures est réalisée directement sur les sites. Ainsi, la température et la salinité sont tout d'abord mesurées in situ, puis dans l'eau surnageant directement après carottage. L'eau surnageant est ensuite immédiatement prélevée pour l'analyse des nutriments. Les échantillons sont ensuite congelés jusqu'à l'analyse au laboratoire. Les profils d'oxygène sont effectués

Chapitre 1 : Sites d'études, échantillonnage et caractéristiques physico-chimiques

immédiatement après prélèvement grâce à une micro-électrode de type Unisense OX500 couplée à un picoampèremètre Unisense PA2000 et à un manipulateur automatique Unisense MM33.

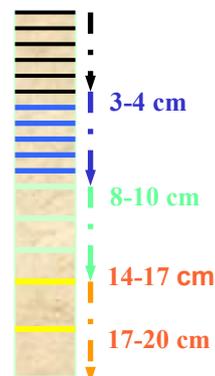
La carotte est découpée en plusieurs tranches de différentes épaisseurs sur une profondeur totale de 20 cm (0.5 cm jusqu'à 3 cm de profondeur, 1 cm de 3 à 6 cm, 2 cm entre 6 et 12 cm et 4 cm jusqu'à 20 cm de profondeur). Ensuite, les échantillons sont centrifugés dans des flacons Whatman VectaSpin comportant un filtre de 0,45 μm à 3000 tours/min et à une température de 4 °C durant 20 minutes. L'eau interstitielle est alors récupérée puis acidifiée à pH=2. Les échantillons sont congelés jusqu'à l'analyse de nutriments.

Echantillonnage :

- Eau surnageante



- Découpe du sédiment



- Filtration de l'eau surnageante



- Centrifugation



Analyse automatique en flux continu



Figure 22 : Procédures d'analyses physico-chimiques

Chapitre 1 : Sites d'études, échantillonnage et caractéristiques physico-chimiques

II Les caractéristiques physico-chimiques du sédiment

II.1 Matériels et méthodes

II.1.2 Analyses physiques

Une aliquote de sédiment humide de volume et de masse connue est séchée durant 5 jours. La perte en masse est utilisée pour calculer la porosité de l'échantillon (Berner 1980). L'autre aliquote est maintenue à 4 °C durant 15 jours au maximum, pour l'analyse granulométrique effectuée par granulométrie laser (LS 200 Beckman coulter laser granulometry).

II.1.3 Analyses chimiques

Le carbone organique et l'azote ont été mesurés par analyse élémentaire après décarbonatation (EL-III CN elemental analyser). Pour les sels nutritifs, les échantillons ont été dans un premier temps décongelés puis dilués au dixième avant d'être analysés en flux séquencé (SFA) pour le phosphate (PO_4^{3-}), le nitrate (NO_3^-) et l'ammonium (NH_4^+) (Aminot & Kerouel, 2006). La mesure de l'ammonium repose sur la réaction de l'ammonium avec l'orthophtaldialdéhyde (OPA) en présence d'un réducteur soufré en milieu légèrement basique. La méthode initialement décrite par Roth (1971) a été adaptée par Genfa *et al.*, (1989) et Kerouel et Aminot (1997). La détermination de l'hydrogène sulfuré (H_2S) a été réalisée par la méthode au bleu de méthylène (Fischer, 1883) adaptée par Cline pour l'eau de mer (Cline, 1969). En présence de Fe (III) et de protons, les sulfures (H_2S , HS^- et S_2) réagissent avec deux molécules de diméthyl-p-phenylène diamine pour former le bleu de méthylène.

II.1.4 Calcul des flux d'ammonium, de sulfure et de nitrate

Trois mécanismes types permettent l'échange de composés dissous à l'interface eau-sédiment. Le premier, la diffusion, décrit la migration des ions du milieu le plus concentré vers le milieu le moins concentré. Le deuxième, la bioturbation, prend en compte le brassage des sédiments par les organismes benthiques. Ce mécanisme induit le plus souvent un enrichissement en sels nutritifs de la colonne d'eau (Donaghay & Klos, 1985) et une oxygénation des sédiments. Enfin les phénomènes d'advection permettent aussi l'échange des composés dissous. Pour les composés solides, la remise en suspension des sédiments et la sédimentation due aux forçages physiques (tels que les courants, la turbulence) ou biologiques (comme la bioturbation) sont les mécanismes d'échanges. Les flux diffusifs à l'interface eau-sédiment sont calculés en utilisant la première loi de Fick adaptée aux sédiments (Krom & Berner, 1980). Cette loi prend uniquement en compte la diffusion moléculaire.

Chapitre 1 : Sites d'études, échantillonnage et caractéristiques physico-chimiques

F_d : Flux de diffusion ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$)

ϕ : porosité du sédiment dans les couches de surface (jusqu'à 3 cm)

D_s : coefficient de diffusion effectif dans le sédiment ($\text{m}^2 \text{h}^{-1}$)

dC/dZ : différence de concentration à l'interface eau – sédiment ($\mu\text{mol m}^{-4}$).

Le gradient de concentration (dC/dZ) est calculé à partir des valeurs de concentrations des eaux de fond jusqu'au début de l'interface. L'utilisation des couches de surface de sédiment comme référence dans le calcul des flux est justifiée par le fait que la matière organique se dégrade à ce niveau essentiellement ou juste en dessous de l'interface eau – sédiment (Aller & Yingst, 1980; Ehrenhauss *et al.*, 2004). Le coefficient de diffusion D_s est directement relié à la porosité du sédiment :

$$D_s = D_0 / (1 - \ln(\phi^2))$$

Où ϕ représente la porosité (sans dimension) et D_0 le coefficient de diffusion moléculaire de l'espèce ionique. Les flux de sulfure ont été calculés en utilisant le gradient de concentration mesuré à l'interface de la zone oxique et de la zone anoxique.

II.2 Résultats

II.2.1 Caractéristiques des sédiments

Les caractéristiques des sédiments des deux sites sont présentées dans les tableaux 5, 6 et 7.

Température, salinité et pH

Ces trois paramètres ont été mesurés dans les eaux surnageant ainsi que dans les eaux interstitielles des sédiments. Dans le tableau 1, sont représentés les intervalles de variation de ces paramètres dans les eaux surnageant et interstitielles en 2007 et en 2008 sous les tables et hors tables sur les deux sites.

A l'aber Benoît, en 2007 la température varie entre 14,9 et 17,7 °C et entre 15,3 et 17,7 °C respectivement dans les sédiments hors table et sous tables. La plus forte température est enregistrée en août et la plus faible en septembre. En 2008, elle varie entre 11,4 et 15,9 °C hors tables et 11,8 et 15,4 °C sous tables, avec la plus forte valeur en juin et la plus faible en mars. Les variations de pH dans les sédiments sont de l'ordre de 7,8 à 8 hors table et 7,6 à 7,8 sous table pour l'année 2007 et de l'ordre de 7,7 à 7,8 hors table et 7,4 à 7,7 sous table en 2008 La salinité varie peu aussi bien en 2007 qu'en 2008 sauf pour le site sous table où une salinité de 24 est observée au mois de juillet.

Chapitre 1 : Sites d'études, échantillonnage et caractéristiques physico-chimiques

A la rivière d'Auray, les températures dans les sédiments varient entre 15,2 et 20,9 et 14,5 et 21,7 °C respectivement hors table et sous table. La plus forte température est observée en septembre et la plus faible en juillet. En 2008, elle varie entre 10,8 et 19,9 °C hors table et 11,1 et 19,3 °C sous table avec la plus forte en mai - juin et la plus faible en mars.

Le pH varie entre 7,2 et 7,9 hors table et entre 7,3 et 7,9 sous table pour l'année 2007 tandis qu'en 2008 les variations sont de l'ordre de 7,5 à 7,9 sous table et de 7,3 à 7,9 hors table.

A l'instar de l'aber Benoît la salinité varie peu entre les sites hors tables et sous tables mais varie d'avantages entre les années 2007 et 2008. En moyenne les températures sont plus élevées à la rivière d'Auray qu'à l'aber Benoît, tandis qu'il existe peu de différence entre les pH des sédiments des deux sites. Les salinités sont presque similaires sur les deux sites en 2007 alors qu'elles sont légèrement plus faibles à la rivière d'Auray qu'à l'aber Benoît en 2008.

Tableau 5: Intervalles de variation de quelques paramètres mesurés dans le sédiment (5 premiers centimètres) en 2007 et en 2008 en aber Benoît et en rivière d'Auray

		Aber Benoît		Rivière d'Auray	
		Hors tables	Sous tables	Hors tables	Sous tables
2007	Température (°C)	14,9 - 17,7	15,3 - 17,7	15,2 - 20,9	14,5 - 21,7
	Salinité	31,2 - 33,2	31 - 33,4	33 - 34,6	33 - 34,6
	pH	7,8 - 8	7,6 - 7,8	7,2 - 7,9	7,3 - 7,9
2008	Température (°C)	11,4 - 15,9	11,8 - 15,4	10,8 - 19,9	11,1 - 19,3
	Salinité	30,5 - 32,8	32,2 - 32,9	27,5 - 29,8	27,1 - 30,7
	pH	7,7 - 7,8	7,4 - 7,7	7,5 - 7,9	7,6 - 7,9

Granulométrie et porosité

La granulométrie est obtenue en se basant sur de la classification internationale généralement utilisée en géologie (Wenworth, 1922). En se basant sur une terminologie simplifiée (avec 7 catégories de particules en fonction de leur taille) de cette classification (Beller & Pomerol, 1977) et la caractérisation sédimentaire de Larssonneur (1971), nous pouvons dire que les sédiments des deux sites d'études sont des « Vases sableuses ». Néanmoins les sédiments de l'aber Benoît tendent vers des sables vaseux (25 ± 5 % et 34 ± 3 % de lutites) tandis que ceux de la rivière d'Auray sont plus vaseux (70 ± 5 % et 67 ± 4 % de lutites) (Figure 23). Les porosités sont relativement plus élevées à la

Chapitre 1 : Sites d'études, échantillonnage et caractéristiques physico-chimiques

rivière d'Auray (82 ± 2 % et 81 ± 2 %) qu'à l'aber Benoît (60 ± 3 et 65 ± 5 %). Pour ces deux paramètres cependant, les différences sont peu marquées entre les sites sous tables et hors tables.

Tableau 6 : Caractéristiques des sédiments de surface (3 premiers centimètres) sauf pour la porosité (couche 0-1 cm) et la granulométrie (couche 0 – 2 cm) sur les sites de l'Aber Benoît et de la Rivière d'Auray pour les 2 années confondues. Les moyennes des mesures sont en caractère gras et les écarts-types entre parenthèses

	Aber Benoît		Rivière d'Auray	
	Hors tables	Sous tables	Hors tables	Sous tables
Nombre d'échantillons (n)	31	31	33	33
Granulométrie silt + Clay (%)	34 (3)	25 (5)	67 (4)	70 (5)
Porosité (%)	65 (5)	60 (3)	81 (2)	82 (2)
C/N	8 (0)	7 (1)	7 (0)	7 (0)

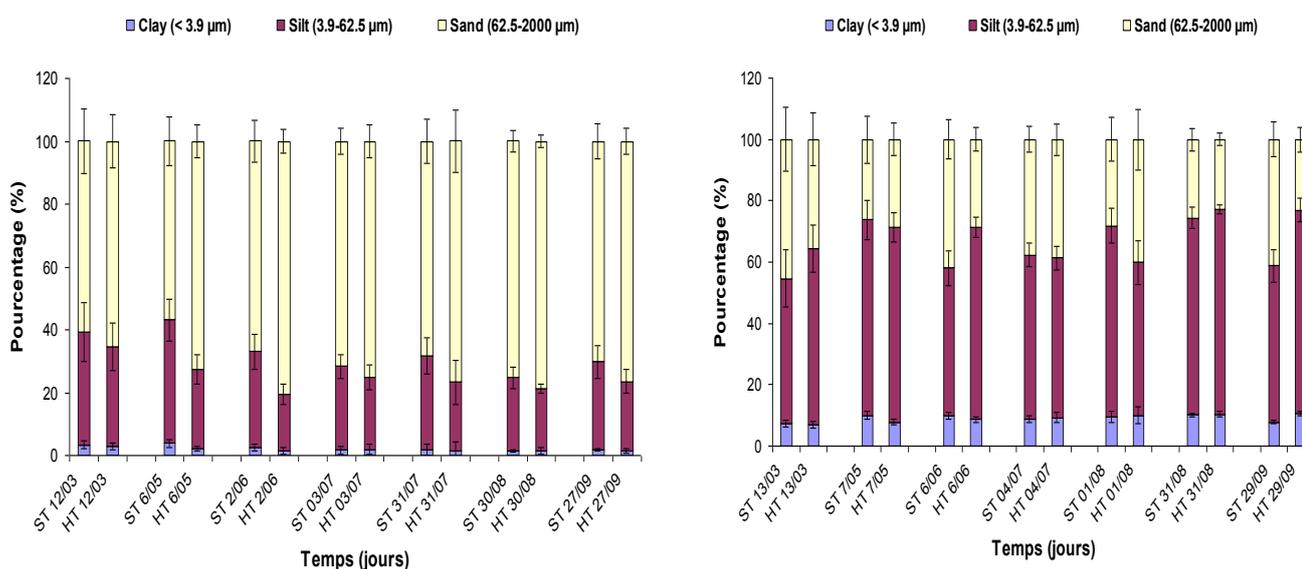


Figure 23 : Granulométrie dans les sédiments superficiels (0-2 cm) de l'aber Benoît (gauche) de la rivière d'Auray (droite). ST : sous tables ; HT : hors tables

Chapitre 1 : Sites d'études, échantillonnage et caractéristiques physico-chimiques

Carbone et azote organiques et le phosphore total

A l'aber Benoît, en 2007, les concentrations de carbone organiques sur 5 cm varient entre 446 et 625 $\mu\text{mol g}^{-1}$ hors table et 560 et 810 $\mu\text{mol g}^{-1}$ sous table. En 2008, les concentrations varient entre 721 et 1243 $\mu\text{mol g}^{-1}$ hors table et 1023 et 1836 $\mu\text{mol g}^{-1}$ sous table. Ces écarts sont dus aux faibles concentrations en mars et les fortes concentrations en juin. Les valeurs des concentrations sont plus fortes dans les sédiments de 2008 et les concentrations de profondeurs sont plus élevées sous tables. Les concentrations d'azote suivent les mêmes profils que celles du carbone. Elles sont plus fortes en 2008 et sont en générale plus élevées sous tables (Cf. Annexe 1 : figures 51 et 52). Les concentrations du phosphore total varient peu entre dates aussi bien en 2007 qu'en 2008. Par ailleurs elles diffèrent peu entre site hors tables et sous tables.

Tableau 7 : Intervalles de variation de quelques paramètres mesurés dans le sédiment (5 premiers centimètres) en 2007 et en 2008 en aber Benoît et en rivière d'Auray

		Aber Benoît		Rivière d'Auray	
		Hors tables	Sous tables	Hors tables	Sous tables
2007	Carbone total ($\mu\text{mol/g}$)	446,7 - 624,9	560,2 - 810,7	963 - 2040	889,2 - 1707,5
	Azote total ($\mu\text{mol/g}$)	54,9 - 75,5	65,8 - 90,4	115,7 - 272,4	119,7 - 204,6
	phosphore total ($\mu\text{mol/g}$)	13,6 - 14,6	14,7 - 16,6	10,9 - 19	10,1 - 19
2008	Carbone total ($\mu\text{mol/g}$)	721,4 - 1243	1023- 1836	1470,9 - 2178,8	1024,4 - 2089,5
	Azote total ($\mu\text{mol/g}$)	117,9 - 190,4	167,6 - 300,9	255,5 - 407,6	190 - 387,6
	phosphore total ($\mu\text{mol/g}$)	12,8 - 15	14,6 - 24	16,6 - 18,8	11,6 - 12,4

Les concentrations de carbone et d'azote sont particulièrement élevées en rivière d'Auray mais contrairement au site de l'aber Benoît, il existe peu de différences entre les concentrations sous tables et celles hors tables. Les rapports C/N (Figure 24) sont comparables à ceux du site de l'aber Benoît et sont autour de 7 et 8 (Tableau 6). Les profils des rapports de C/N en fonction de la profondeur du sédiment et sur une année fictive créé à partir des valeurs de 2008 (mars – mai –juin) et de 2007 (juillet –août –septembre) sont présentés dans la figure 2. Les rapports sont plus faibles en mars, mai 2008 et augmentent en juillet pour atteindre des valeurs de 9 en aber Benoît et de 7 en rivière d'Auray.

Chapitre 1 : Sites d'études, échantillonnage et caractéristiques physico-chimiques

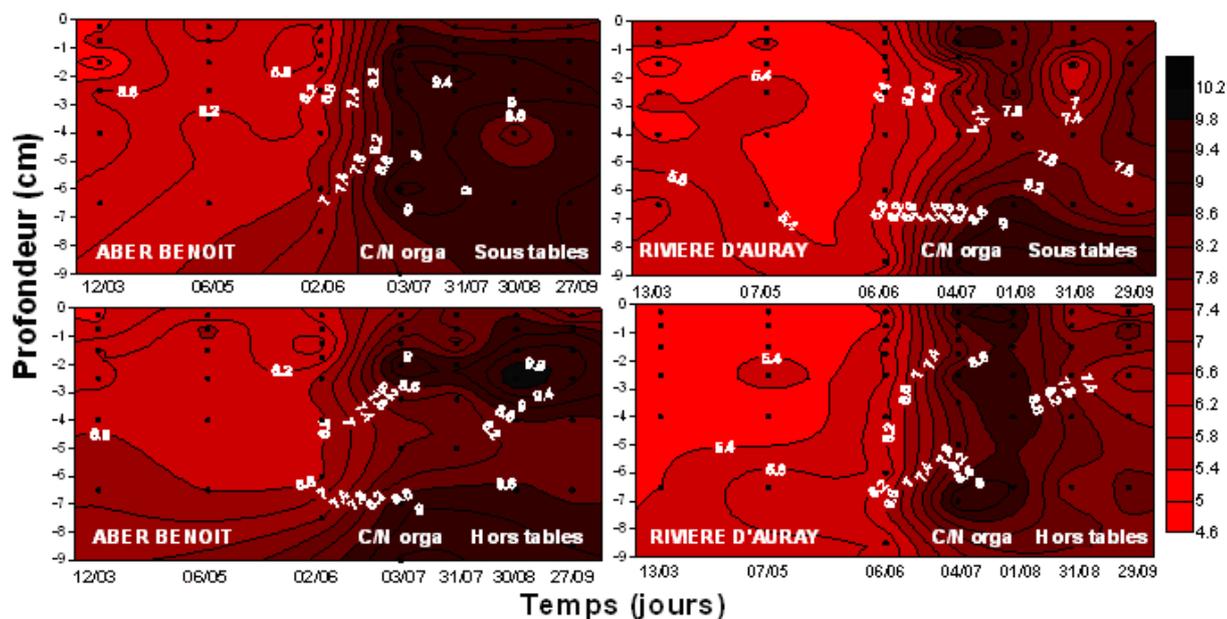


Figure 24 : Rapport C/N (organique) dans les sédiments pour les sites sous tables et hors tables de l'aber Benoît et de la rivière d'Auray tout au long de la période d'étude (Juillet, Août et Septembre 2007 et Mars, Mai et Juin 2008). Les rapports sont exprimés en mol/mol.

La chlorophylle *a*

En aber Benoît, on observe deux maximums de concentration en chlorophylle *a* pour le site sous tables (Figure 25). Le premier se produit en mai à la surface ($50 \mu\text{g g}^{-1}$), le second en juin à 6 cm de profondeur ($40 \mu\text{g g}^{-1}$). Pour le site hors tables, les concentrations restent faibles. En rivière d'Auray, sous les tables, deux maximums de chlorophylle *a* sont mesurés en surface au cours des mois de mai ($70 \mu\text{g g}^{-1}$) et d'août ($60 \mu\text{g g}^{-1}$). Hors tables, un premier maximum de chlorophylle *a* est visible en mars à la surface ($70\text{-}80 \mu\text{g g}^{-1}$) et un deuxième en mai à 4 cm de profondeur ($80 \mu\text{g g}^{-1}$). Fin septembre, une légère augmentation est décelée en surface ($40 \mu\text{g g}^{-1}$, Figure 3).

Chapitre 1 : Sites d'études, échantillonnage et caractéristiques physico-chimiques

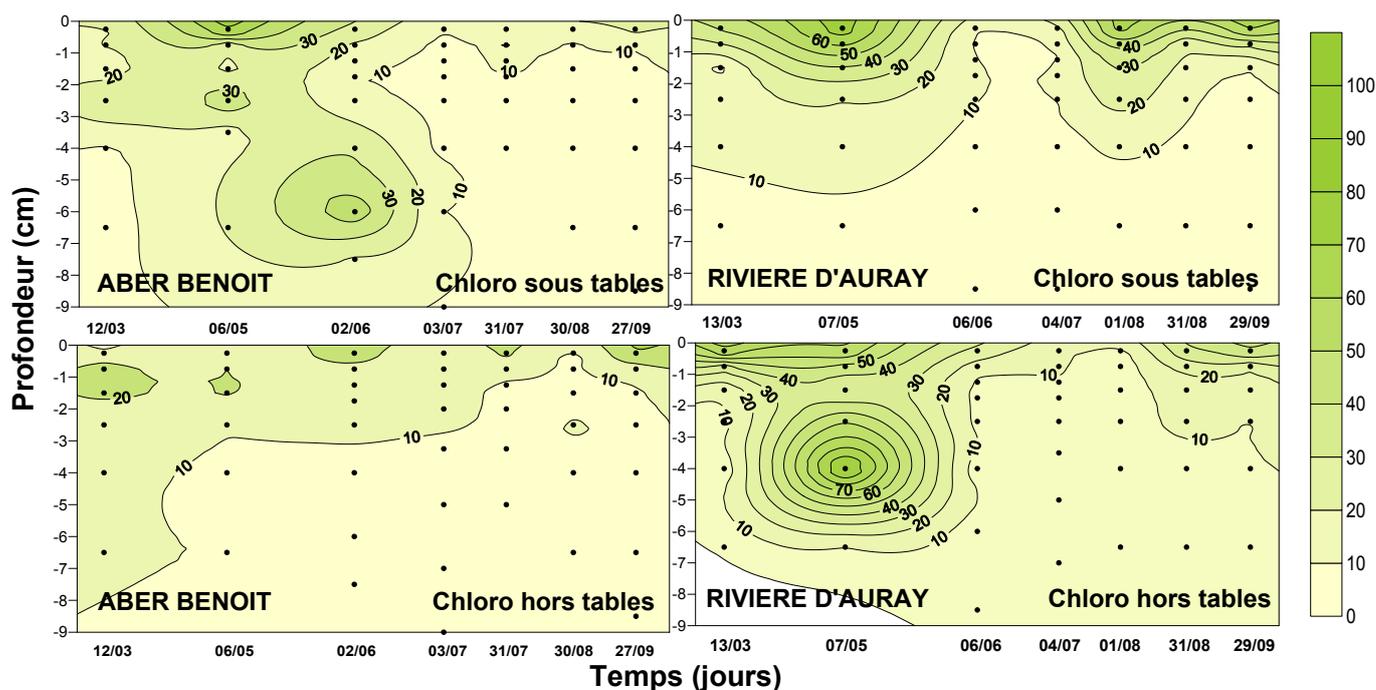


Figure 25 : Distribution de la chlorophylle *a* dans les sédiments pour les sites hors tables et sous tables de l'aber Benoît et de la rivière d'Auray tout au long de la période d'étude (Juillet, Août et Septembre 2007 et Mars, Mai et Juin 2008). Les concentrations sont exprimées en $\mu\text{g g}^{-1}$ de sédiment.

Oxygène

Les concentrations en oxygène sont présentées dans la figure 26. Dans les eaux supra benthiques du site sous table de l'aber Benoît, elles varient de $235 \mu\text{mol l}^{-1}$ (juillet) à $300 \mu\text{mol l}^{-1}$ (juin) sur la durée de l'étude (a). Les concentrations les plus basses sont observées de juillet à septembre 2007. Pour le site hors tables, les concentrations oscillent entre $255 \mu\text{mol l}^{-1}$ (mai) et $285 \mu\text{mol l}^{-1}$ (mars) avec une augmentation à 0,8 cm du sédiment jusqu'à $340 \mu\text{mol l}^{-1}$ (août) (b). En rivière d'Auray, les concentrations sous tables sont comprises entre $165 \mu\text{mol l}^{-1}$ (août) et $305 \mu\text{mol l}^{-1}$ (juin) (c). Hors tables, elles varient de $200 \mu\text{mol l}^{-1}$ (août) à $320 \mu\text{mol l}^{-1}$ (mars). En moyenne, les plus faibles concentrations sont observées pour l'année 2007 (d). Les profils de concentration de l'oxygène dissous dans le sédiment indiquent une chute brutale du gradient de concentration quelque soit le mois ou le site. Les profondeurs d'infiltration de l'oxygène en aber Benoît vont de 2,0 mm (août : hors tables et mai : sous tables) à 3,8 mm (mars : sous tables et septembre : hors tables). Toutefois des micro pics de concentration en oxygène sont observés dans le sédiment en juin et juillet en aber Benoît hors des tables. En rivière d'Auray, les profondeurs d'infiltration sont

Chapitre 1 : Sites d'études, échantillonnage et caractéristiques physico-chimiques

comprises entre 2,6 mm (septembre : sous tables et juin : hors tables) et 4,7 mm (septembre : hors tables).

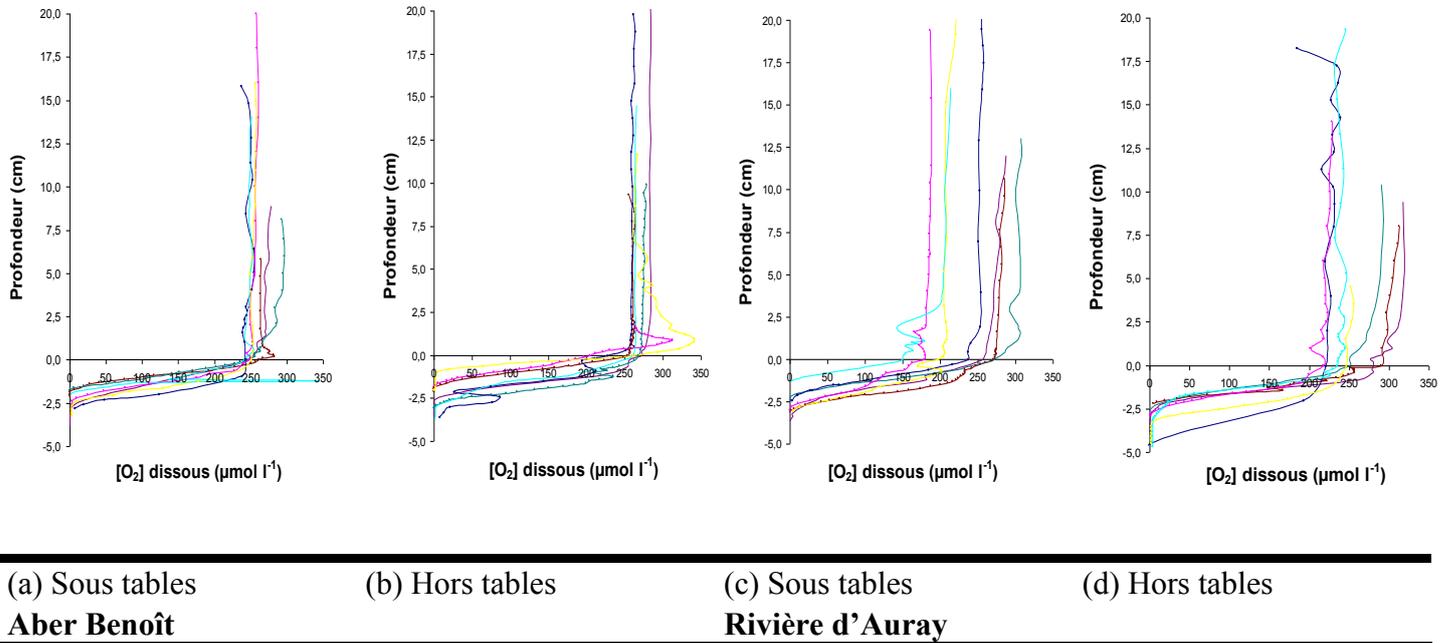


Figure 26 : Profils verticaux d'oxygène en fonction de la profondeur à l'interface eau-sédiment sur les sites de l'aber Benoît et de la rivière d'Auray pour les sites hors tables et sous tables tout au long de la période d'étude (résolution de 100 μm à proximité de l'interface). Les concentrations sont exprimées en $\mu\text{mol l}^{-1}$.



Chapitre 1 : Sites d'études, échantillonnage et caractéristiques physico-chimiques

Phosphate

Dans l'aber Benoît, les concentrations de phosphate sont supérieures sous tables (par rapport au site référence) avec un maximum de $70 \mu\text{mol l}^{-1}$ en mai et juin à partir de 2 cm de profondeur ainsi qu'en septembre à 4 et 7 cm. Les valeurs de surface sont proches de $5 \mu\text{mol l}^{-1}$. Hors tables, les concentrations ne dépassent jamais $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Figure 27). En rivière d'Auray en revanche, les deux sites (hors tables et sous tables) présentent des concentrations supérieures à $70 \mu\text{mol l}^{-1}$. Sous tables, les maximums apparaissent en juin et fin août dans les sédiments superficiels (1 et 2 cm). Les valeurs de surface sont en moyenne plus élevées qu'à l'aber Benoît (20 à $30 \mu\text{mol l}^{-1}$ contre 10 à $15 \mu\text{mol l}^{-1}$). Hors tables, une première zone de forte concentration est omniprésente de mars à début juillet ($70 \mu\text{mol l}^{-1}$) et une deuxième en août/septembre vers 7 cm de profondeur. Une période marquée par de faibles concentrations (5 - $10 \mu\text{mol l}^{-1}$) apparaît durant le mois de juillet.

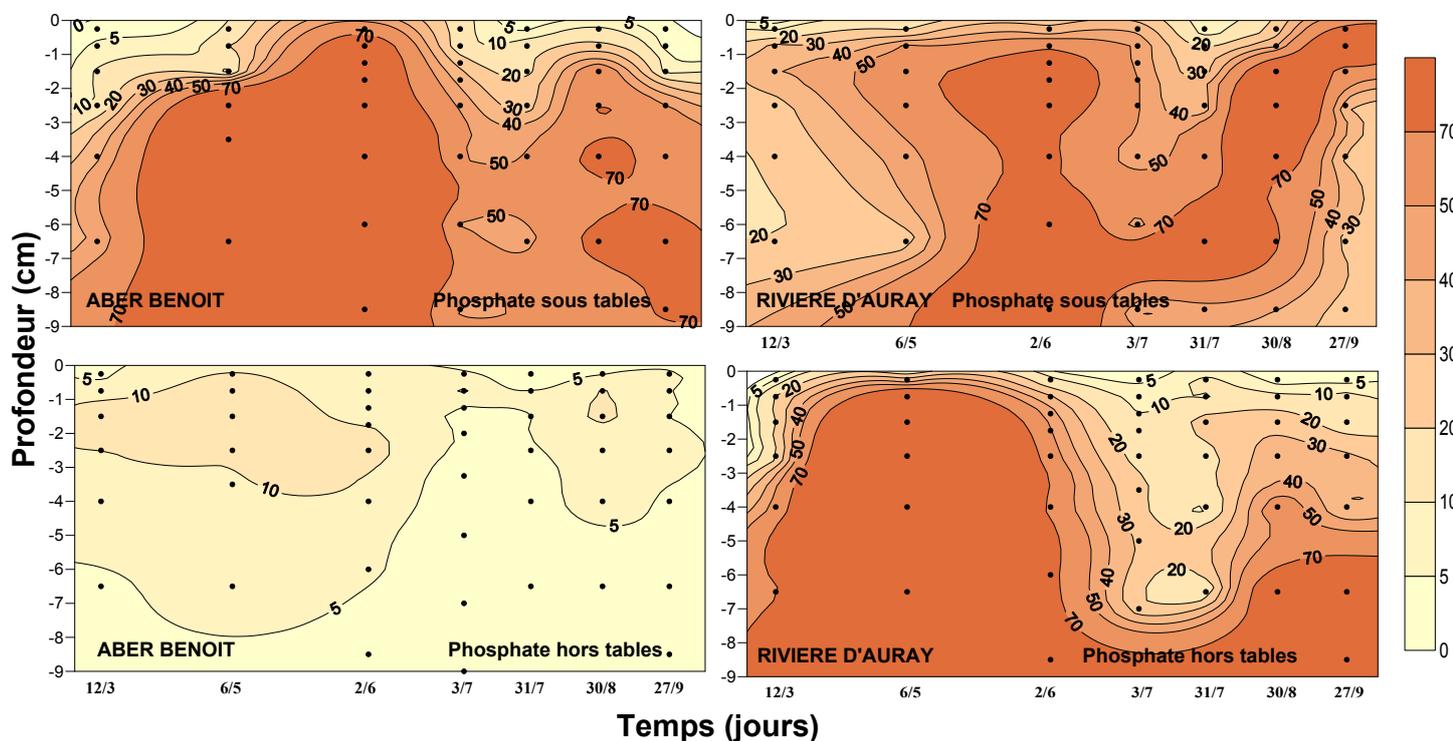


Figure 27 : Distribution du phosphate dans les eaux interstitielles pour les sites hors tables et sous tables de l'aber Benoît et de la rivière d'Auray tout au long de la période d'étude (juillet, mars et septembre 2007 et mars, mai et juin 2008). Les concentrations sont exprimées en $\mu\text{mol l}^{-1}$.

Ammonium

Chapitre 1 : Sites d'études, échantillonnage et caractéristiques physico-chimiques

Dans l'aber Benoît, une nette différence est visible entre le site hors tables et le site sous tables. Des concentrations supérieures à $2000 \mu\text{mol l}^{-1}$ de mai à juin, à 5 cm et plus de profondeur, sont mesurées sous table. Les valeurs de surface avoisinent les 100 à $250 \mu\text{mol l}^{-1}$. Pour le site hors tables, aucun pic d'ammonium n'est observé (concentrations de $200 \mu\text{mol l}^{-1}$) (Figure 28). En rivière d'Auray, hors tables, un maximum de concentration est observé ($1000 \mu\text{mol l}^{-1}$) en mai entre 3 et 7 cm de profondeur. Sous tables, des valeurs avoisinant les $750 \mu\text{mol l}^{-1}$ sont mesurées en profondeur (8 cm) en juin et en août. Les valeurs de surface sont proches des $250 \mu\text{mol l}^{-1}$ et dépassent les valeurs obtenues dans les premiers centimètres pour le site référence ($100 \mu\text{mol l}^{-1}$).

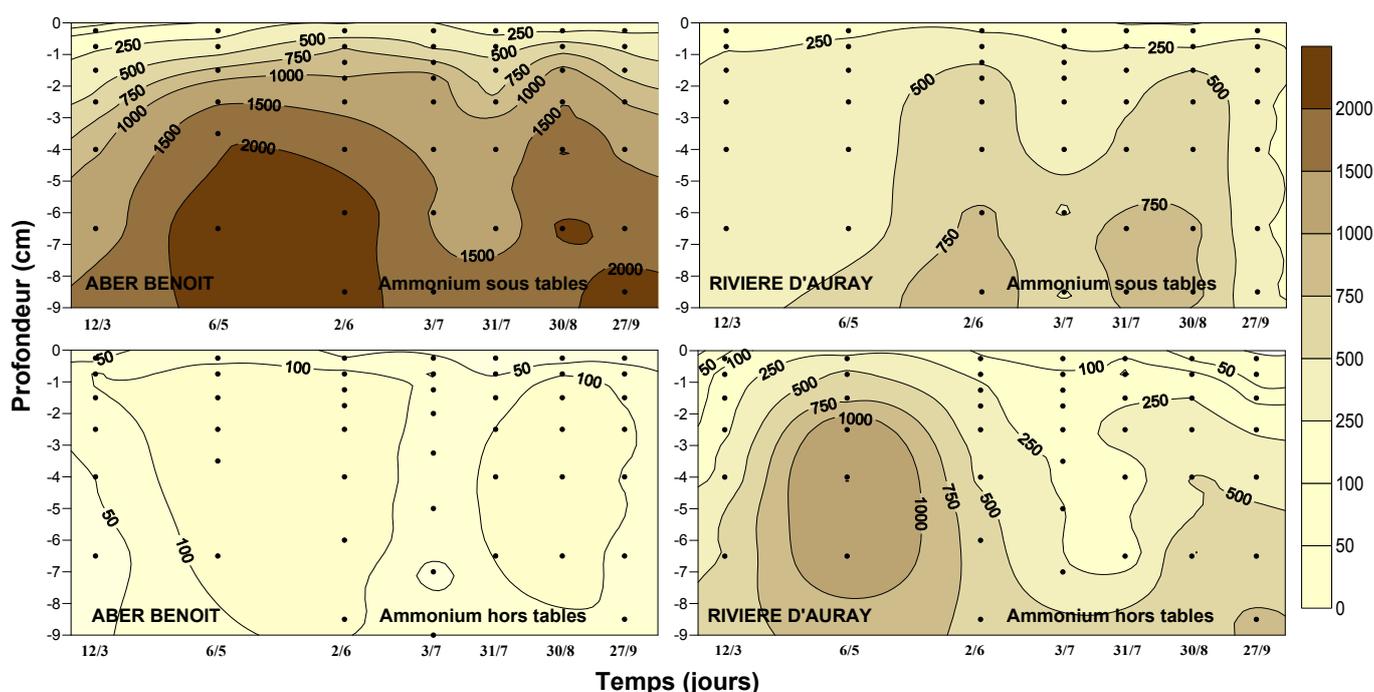


Figure 28 : Distribution de l'ammonium dans les sédiments pour les sites hors tables et sous tables de l'aber Benoît et de la rivière d'Auray tout au long de la période d'étude (Juillet, Mars et Septembre 2007 et Mars, Mai et Juin 2008). *Les concentrations sont exprimées en $\mu\text{mol l}^{-1}$*

Chapitre 1 : Sites d'études, échantillonnage et caractéristiques physico-chimiques

Sulfure

Les concentrations en sulfure (H_2S , HS^- et S^{2-}) diffèrent nettement entre les sites sous table et hors table. En aber Benoît, sous table, de forts taux ($> 3000 \mu\text{mol l}^{-1}$) sont mesurés vers 7 cm de profondeur en Juin et vers 4 et 7 cm de fond fin Août. Pour le site référence, les concentrations sont toujours inférieures à $400 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Figure 29). En rivière d'Auray, le phénomène inverse est observé. Sous table aucun pic de sulfure n'est mesuré alors que hors table des concentrations supérieures à $1400 \mu\text{mol l}^{-1}$ apparaissent en mai à 4 cm de profondeur.

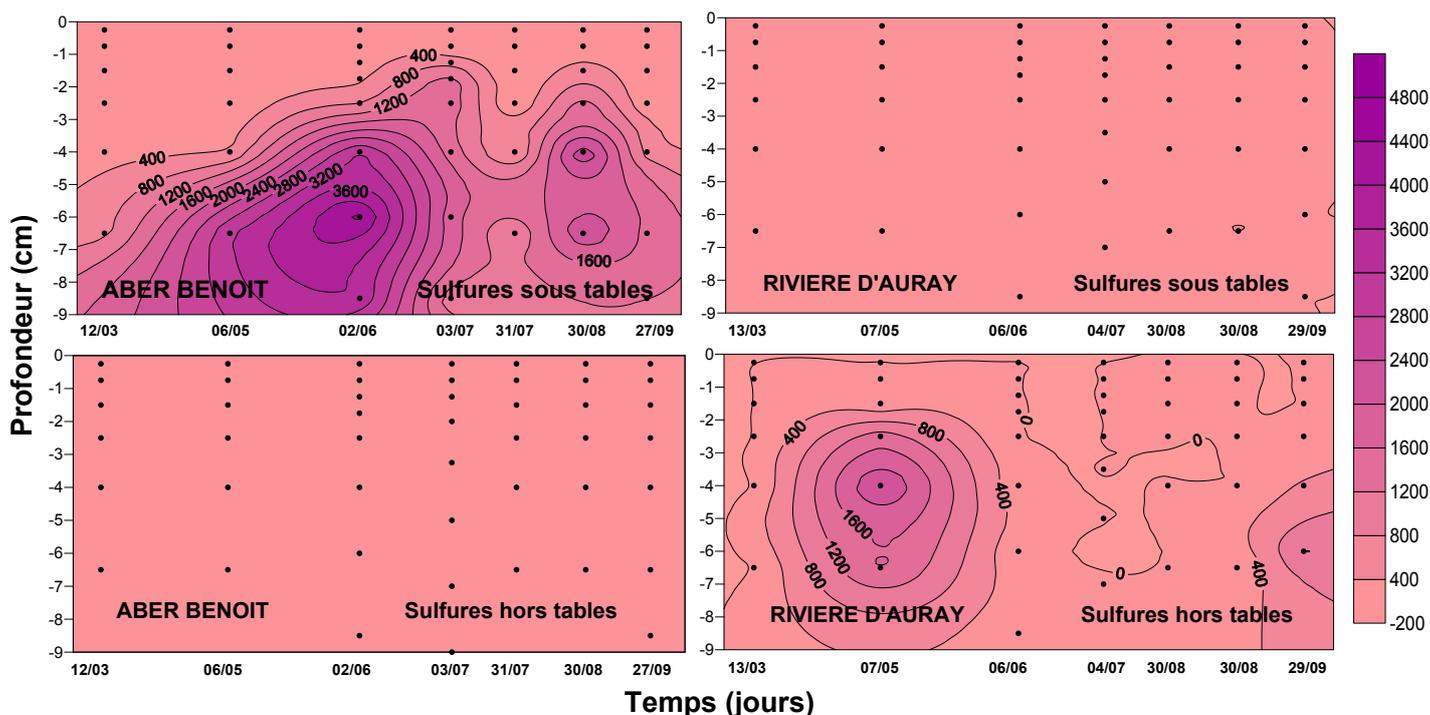


Figure 29 : Distribution des sulfures dans les eaux interstitielles pour les sites hors tables et sous tables de l'aber Benoît et de la rivière d'Auray tout au long de la période d'étude (Juillet, Mars et Septembre 2007 et Mars, Mai et Juin 2008). *Les concentrations sont exprimées en $\mu\text{mol l}^{-1}$.*

II.2.3 Flux d'ammonium et sulfure dans les sédiments

Plusieurs observations suggèrent que les sédiments des deux sites sont peu perméables : 1) en prélèvement nous n'avons pas eu de percolation d'eau interstitielle; 2) en Aber Benoît, les profondeurs de pénétration de l'oxygène ne dépassent jamais 4-5 mm (il y a peu de différence avec la rivière d'Auray) ; 3) le diamètre médian en aber Benoît (100-200 μm) est inférieur aux sédiments présentés comme perméables dans les publications (diamètre médian : 250 μm – 400 μm (Ziebis *et*

Chapitre 1 : Sites d'études, échantillonnage et caractéristiques physico-chimiques

al., 1996 ; Precht, *et al.*, 2004). Les flux d'ammonium et de sulfures ont été alors calculés à partir de la loi de fick ne prenant en compte que la diffusion moléculaire.

Ces flux sont positifs et sont dirigés vers la surface du sédiment (flux upward). Les flux d'ammonium sont plus forts en juin et en juillet pour l'aber Benoît (jusqu'à $1020 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$) sous les tables (annexe 1 Fig.53 et 54) et en mai pour la rivière d'Auray ($317 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$), même si dans ce dernier site, les variations saisonnières sont moins marquées avec des flux minimaux compris entre 150 et $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$. Les flux hors table sont de 30 à $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ dans l'aber Benoît et de 50 à $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ en rivière d'Auray. Le calcul par la formule de Johansson & Wedborg (1980) a permis de trouver des pourcentages de 2,7 et 2,8 % de flux d'ammoniac (à partir des flux d'ammonium calculés) pour le mois de juin et juillet dans l'aber Benoît sous les tables. Ces pourcentages correspondent, à ces périodes, à des flux de 19,4 et $27,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ dans l'eau surnageante.

Ils sont importants en mai, début juillet et en août pour le site sous table de l'aber Benoît (jusqu'à $215 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$) et quasi nuls voire négatifs pour le site référence. En rivière d'Auray, ils sont généralement plus forts sous les tables (environ $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ avec un pic à $105 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$) mais apparaissent plus élevés ponctuellement hors table en mai et en septembre (198 et $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$). Dans l'aber Benoît, ils sont maximums aux alentours du mois de juillet pour les deux formes ioniques (NH_4^+ , HS^-).

II.3 Discussion

Les sédiments des deux sites ostréicoles sont des vases sableuses légèrement différentes avec une proportion de lutites supérieure dans les sédiments de la rivière d'Auray. Nous n'avons pas constaté de différences significatives entre la nature granulométrique des sédiments sous table et hors table sur les deux sites d'étude. Les organismes filtreurs comme les huîtres participent par leur biodépôts (fecès et pseudofecès) à la sédimentation des particules fines dans les sédiments. Cette absence d'impact sur la granulométrie et la porosité observée sur ces deux sites pourrait s'expliquer par la faible distance entre les deux stations d'échantillonnages (30 m) et l'effet de l'hydrodynamisme qui disperse et remanie les dépôts sédimentaires au grés des marées et des tempêtes. Cependant les concentrations en chlorophylle *a*, carbone, azote et phosphate organique sont plus fortes sous tables, principalement en 2008 en aber Benoît. En rivière d'Auray de fortes concentrations peuvent être observées dans le sédiment hors tables mais en générale les concentrations sont similaires à celles des sédiments sous tables. Les concentrations en carbone

Chapitre 1 : Sites d'études, échantillonnage et caractéristiques physico-chimiques

organique sont nettement plus élevées en rivière d'Auray probablement dues aux apports du Loch où se pratiquent des activités agricoles mais aussi à la présence de fermes avicoles qui masqueraient l'effet des biodépôts des huîtres.

Bien que la chlorophylle *a* soit un bon indicateur de la biomasse des algues, la majorité des particules (95 %) composant les biodépôts (fèces et pseudo fèces) des huîtres (Sornin, 1984), contiennent aussi de la chlorophylle *a* non dégradée. Dans les deux sites, les zones de fortes concentrations observées en mai et en août peuvent être attribuées à des floraisons phytobenthiques et phytoplanctoniques mais aussi aux biodépôts. Ce phénomène est beaucoup moins marqué en aber Benoît hors table où les courants doivent limiter la sédimentation des efflorescences. En effet, la présence des tables ostréicoles favorise la sédimentation des particules en suspension en jouant sur l'hydrodynamisme (Nugues *et al.*, 1996). En aber Benoît, les sédiments sous tables et hors sont exondés et reçoivent suffisamment de lumière pour la photosynthèse du phytobenthos. Par conséquent, les fortes concentrations de chlorophylle *a* sous tables doivent avoir pour source la sédimentation naturelle du phytoplancton ou la sédimentation forcée via la biodéposition. Ainsi, le flux de sédimentation et la quantité de matière organique plus élevés sous les tables engendrent une activité microbienne de dégradation plus intense et une consommation d'oxygène plus élevée aboutissant à l'anoxie du sédiment. La dégradation devient anoxique en fonction de l'épaisseur de pénétration de l'oxygène. Cette dégradation qui est réalisée par des bactéries anaérobies utilisant les nitrates et les sulfates conduit à la production d'ammonium et de sulfures. En aber Benoît, l'impact de la présence des huîtres sur les processus biogéochimiques est mis en évidence par les concentrations d'ammonium et de sulfures plus élevées dans les sédiments sous table. En rivière d'Auray on observe une dégradation égale voire plus élevée dans les sédiments hors table, qui est probablement liée au choix de la station de référence (présence de macro algues), aux activités anthropiques ainsi qu'aux apports du Loch (bassin versant de 180 km²).

L'acquisition des résultats pour les concentrations en sulfure, en azote ammoniacal et en phosphate (également étudié) s'est faite dans une échelle de temps d'une année environ afin de percevoir d'éventuelles variations. Nous avons créé une année idéalisée à partir des dates d'échantillonnages de 2007 et 2008. Tous ces composés varient de manière concomitante. Les maximums de concentration sont observés pour les sites sous table en mai et juin dans l'aber Benoît tandis qu'en rivière d'Auray, les maximums semblent être plus visibles hors table durant le mois de mai. Sornin *et al.*, (1990) avaient montré qu'il existait un laps de temps entre le dépôt de matière organique dans le sédiment dans une claire à huître et l'apparition des produits de la minéralisation dans le sédiment. La différence de concentration de ces composés entre les sédiments sous table et hors table serait

Chapitre 1 : Sites d'études, échantillonnage et caractéristiques physico-chimiques

liée, comme mentionné plus haut, à un apport de matière organique plus fort sous tables. Hors des tables tous les processus sont moins intenses. La diffusion de l'oxygène à partir des eaux sus-jacentes équilibre la consommation bactérienne. Une production d'azote ammoniacal est effectivement observée mais à des niveaux moindres. En revanche, il n'y a pas de réduction des sulfates en sulfures.

Les composés issus de la dégradation et formés dans le sédiment diffusent vers l'interface eau - sédiment en fonction leur concentration initiale dans le sédiment. En effet, des concentrations élevées en sulfures et en ammonium dans les sédiments peuvent augmenter les concentrations dans les eaux supra benthiques par diffusion ou par advection (Hansen *et al.*, 1978). Ces substances sont toxiques à partir d'une certaine concentration pour la majorité des espèces vivantes (Van Sprang *et al.*, 2000) et notamment les huîtres. Les formes toxiques du sulfure sont le HS^- et encore plus le H_2S prépondérants dans l'eau de mer, tandis que l'ammonium est toxique par sa forme non ionisée (NH_3) présente jusqu'à 16 % dans l'azote ammoniacal en fonction du pH. Toutefois, au pH de l'eau de mer, seulement de 2 à 5 % de l'azote ammoniacal sont sous forme non ionisée. Les niveaux de NH_3 considérés comme toxiques ne peuvent être atteints que par le cumul de rejets contenant de l'azote ammoniacal (rejets urbains) et de poussées phytoplanctoniques intenses ayant pour effet secondaire un accroissement du pH, donc de la fraction non ionisée de l'azote ammoniacal (Aminot & Kerouel, 2004). Cependant, des travaux ont montré qu'à un pH inférieur à 8,3, la toxicité avait pour cause un effet combiné de l'ammonium et de l'ammoniac (Kater *et al.*, 2006). Pour les ions sulfure, il a été prouvé qu'ils pouvaient être toxiques de part leur nature mais aussi en formant des complexes solides insolubles avec les métaux et en affectant le devenir de l'animal. Cette toxicité s'explique par la présence d'un doublet d'électrons libres capable de se lier aux éléments biologiques accepteurs d'électrons pour former des complexes à l'origine de lésions métaboliques. La toxicité de ces composés réduits peut aussi agir sur l'environnement de l'huître, notamment sur le phytobenthos, ce qui induit une dégradation de la qualité des ressources trophiques benthiques (Samain, 2007). Les mortalités se manifestant surtout en période de mortes eaux, il n'est pas exclu alors que ces composés puissent engendrer des stress aigus chez les huîtres.

Pour les eaux de surface, l'U.S. EPA (Environmental Protection Agency) propose des limites acceptables de $2 \mu\text{g l}^{-1}$ ($0,06 \mu\text{mol l}^{-1}$) pour les ions sulfure et de $35 \mu\text{g l}^{-1}$ ($2 \mu\text{mol l}^{-1}$) pour l'ammoniac (NH_3) (Wang & Chapman, 1999). En effet, les ions sulfure ont un rôle plus important que l'ammoniac dans la détermination de la toxicité du sédiment. La valeur de toxicité déterminée pour l'espèce *Crassostrea gigas* est de $1,4 \text{ mg l}^{-1}$ soit $42 \mu\text{mol l}^{-1}$ pour les sulfures. A cette concentration et au bout de 96 h, le taux de mortalité dépasse 50 %. Aucune donnée précise n'a été

Chapitre 1 : Sites d'études, échantillonnage et caractéristiques physico-chimiques

relevée pour la valeur de toxicité de l'ammoniac envers cette espèce. Quelques données font état d'une toxicité à partir de 12 mg l^{-1} d'ammoniac pour des juvéniles de moules d'eau douce (Wang *et al.*, 2007). Les concentrations maximales de l'ammoniac dans les eaux interstitielles des sédiments situés sous les tables en aber Benoît ($25 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$) et en rivière d'Auray ($20 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$), mais aussi celles des sulfures ($4000 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ et $400 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ respectivement en aber Benoît et en rivière d'Auray), suggèrent qu'une remise en suspension brusque du sédiment ou qu'un contact direct de l'huître avec le sédiment pourrait être fatal pour ces animaux.

Conclusion

Le but de cette étude était de déterminer les caractéristiques physico-chimiques des sédiments des deux sites d'études (l'aber Benoit et la rivière d'Auray) ainsi que l'effet de la présence des huîtres sur les caractéristiques du sédiment. Les mesures d'oxygène effectuées à l'interface eau-sédiment ont montré un état d'anoxie du sédiment (pénétration d'oxygène inférieure à 5 mm) sur les deux sites. Cependant, elles n'expliquent pas la différence de minéralisation entre un site hors table et un site sous table car elles reflètent un bilan consommation sur production, sans que l'on puisse quantifier l'influence respective de chacune de ces composantes dans notre étude. Il a donc été impossible de révéler un impact des activités ostréicoles sur les concentrations en oxygène mais aussi sur la granulométrie et la porosité. Les concentrations en composés organiques sont plus élevées en rivière d'Auray et seraient liées à la présence de fermes avicoles, au bassin versant mais aussi à l'échouage de macrophytes dans la zone de référence. Ainsi, il est probable que l'apport supplémentaire de matière organique par ces sources masque l'effet de la présence des huîtres sur les concentrations des composés organiques et inorganiques dans le sédiment. L'effet des installations ostréicoles est plus évident à l'aber Benoît où les concentrations en ammonium, sulfures sont légèrement plus élevées sous les tables qu'en dehors des tables. Ces fortes concentrations sont liées à l'augmentation des activités bactériennes. L'essentiel de la matière organique restant dans les sédiments est alors sous forme de composés plus résistants à la dégradation comme le témoignent les rapports C/N proches de 9 en 2007 en aber Benoît. Quant au site de la rivière d'Auray, il semble y avoir d'autres sources de matières organiques qui masquent l'apport provenant des huîtres et l'apport saisonnier lié au bloom phytoplanktonique. Il est important de relever que sur le site de la rivière d'Auray, la température et les concentrations en matières organiques sont plus fortes qu'en aber Benoît. Curieusement, les concentrations des composés issus de la dégradation y sont moins élevées. Cela suggère que les activités bactériennes de dégradation y sont moins intenses. Au regard de la variabilité inter-site et inter-annuelle des concentrations, il faudrait probablement beaucoup plus de

Chapitre 1 : Sites d'études, échantillonnage et caractéristiques physico-chimiques

réplicats « hors tables » et « sous tables », dans un plus grand nombre de sites pour mettre en évidence un effet de la présence des tables sur les paramètres étudiés.

Les flux des « stressseurs » chimiques potentiels (ammoniac, sulfure) sont très différents entre les sites sous table et hors table et sont plus forts en mai et juin qui correspondent à la période où apparaissaient souvent les mortalités ou aux périodes les précédant. Dans notre dispositif expérimental, les taux de mortalités relevés ne dépassaient pas les 15 % en 2007. En 2008, les campagnes se sont arrêtées au mois de juin, avant l'apparition des fortes mortalités. Par conséquent cet aspect n'a pas été considéré dans notre étude. Néanmoins, les concentrations élevées enregistrées pourraient ainsi jouer un rôle soit directement sur les individus de *C. gigas* en affaiblissant leurs fonctions immunitaires, soit indirectement sur la ressource trophique. Les graphes représentant les flux de ces composés (Annexe1 : figures 43 et 44) montrent : 1°) que les flux théoriques sont élevés sous-tables 2°) que dans le cas d'une mise en suspension, de telles concentrations sont probablement toxiques pour les animaux. Les flux de ces composés mais aussi ceux du phosphore et des nitrates ont été également calculés dans le but de déterminer leur relation avec la structuration des communautés bactériennes du sédiment que nous allons présenter dans le chapitre 2.

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

**Chapitre 2 : Etude de la structure
des communautés bactériennes des
sédiments (Article 1)**

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

Une partie des résultats des analyses de ce chapitre sont consignés dans un article en préparation dont l'intitulé est : « **Impact of oyster activities on sediment bacterial structure in two farms in France** ». Il est présenté en langue anglaise à la suite de la partie méthodologique ainsi que quelques résultats (non transcrit dans le texte en anglais) présentés ci-après en langue française.

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons mentionné les effets de l'ostréiculture sur les processus biogéochimiques du sédiment. Ces résultats sont à ajoutés à une série d'études menées dans l'étang de Thau, qui ont montré l'impact des activités ostréicoles sur les caractéristiques physico-chimiques du sédiment et sur les populations benthiques (Mazouni *et al.*, 1996a; Mazouni *et al.*, 1996b). Selon ces auteurs, l'accumulation de matière organique induite par ces activités provoque l'augmentation des flux benthiques et des modifications dans les populations benthiques. D'autres études font également état d'une modification des activités bactériennes sous l'influence de l'apport de matière organique (Richardson *et al.*, 2008; Vezzulli *et al.*, 2002). Très peu de données cependant décrivent l'impact de la matière organique sur la diversité de la population bactérienne. Les quelques études qui ont été réalisées dans des sédiments de fermes piscicoles, mettent en évidence l'augmentation de la densité des bactéries hétérotrophes aérobies, des *Vibrio* (La Rosa *et al.*, 2004) et une plus grande variabilité de la composition des communautés bactériennes (Kawahara *et al.*, 2009). Sachant que les bactéries jouent un rôle crucial dans la décomposition et la minéralisation de la matière organique dans les environnements côtiers (Gooday *et al.*, 1990), l'augmentation de la matière organique induite par les activités aquacoles peut modifier la composition bactérienne (Rajendran *et al.*, 1997). Ainsi l'apport de fèces ou de pseudo-fèces par les huîtres devrait provoquer une modification de la communauté bactérienne dans le sédiment situé en dessous des tables. Dans le chapitre précédent, nous avons montré que la dégradation de la matière organique était plus intense sous tables d'huîtres sur le site de l'aber Benoît. En rivière d'Auray, bien que d'autres sources de matière organique masquent l'effet de la présence des tables, les concentrations de matières organiques, d'ammonium et de sulfures sont plus fortes hors tables. Les objectifs de cette étude visent: 1) à étudier la structure des communautés bactériennes des différents sites d'études, 2) à analyser l'impact de la présence des huîtres sur ces communautés, et 3) identifier les facteurs physico-chimiques qui influencent la variation de la structure des communautés bactériennes. De plus, les biodépôts sont composés de bactéries provenant de l'huître, nous nous sommes particulièrement intéressés à la présence d'espèces du genre *Vibrio*, groupe fréquemment retrouvé chez les mollusques bivalves (Cf. bibliographie – l'huître creuse *C. gigas*). Pour cette étude, nous avons choisi comme outil la DGGE dont le principe est décrit dans la partie bibliographique « Sédiment ».

1. Matériel et méthodes

1.1. Extraction et quantification d'ADN du sédiment

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

Les échantillons de sédiments destinés aux analyses de la flore bactérienne ont été prélevés de la même façon que les échantillons pour l'analyse physico-chimiques ; c'est-à-dire, trois répliquats (carottes) sous les tables et trois répliquats en dehors des tables (station témoin) pendant les campagnes de 2007 (soit 6 échantillons par date et par site). En 2008, 4 répliquats sont prélevés sous et hors tables afin d'améliorer les traitements statistiques en février, mars, mai et juin. Les sédiments sont prélevés à l'aide de tubes falcons jusqu'à 5 cm de profondeur et sont conservés dans de la glace jusqu'au laboratoire et sont conservés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à l'extraction de l'ADN.

La phase critique de l'extraction de l'ADN du sédiment, est de pouvoir séparer l'ADN des substances humiques et des protéines qui interfèrent avec la PCR (Tebbe & Vahjen, 1993). Plusieurs méthodes ont été testées afin d'identifier la méthode la mieux adaptée pour l'isolation et la purification de l'ADN des sols et des sédiments. Le protocole choisi et décrit ci-dessous correspond à une extraction directe au phénol-chloroforme (Zhou *et al.*, 1996), que nous avons légèrement modifiée, et une purification sur colonne (Wizard, Promega).

Pour chaque échantillon, on introduit 5 g de sédiment dans un tube Falcon de 50 ml, auquel on ajoute 13,5 ml de tampon d'extraction. Afin de lyser plus facilement les parois des gram+, les échantillons subissent un choc thermique, passage de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $+65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Puis pour dégrader les protéines, on ajoute dans les tubes 50 μl de protéinase K (20mg/ml) qui sont ensuite incubés pendant 30 min à 37°C sous agitation horizontale (150 rpm). Puis 1,5 ml de SDS 20% sont ajoutés et les échantillons sont mis à incuber pendant 2 h au bain-marie thermostaté à $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Les tubes sont centrifugés à température ambiante à 5700 rpm pendant 10 minutes. Dans des tubes Falcon de 50ml conservés dans de la glace, le surnageant est récupéré en évitant la couche blanche qui s'est formée à la surface du surnageant et qui contient les débris cellulaires. Cette extraction est réalisée deux fois et les surnageants sont finalement mélangés. Pour extraire l'ADN, un volume égal de chloroforme/alcool isoamylique (24 -1, v/v) est ajouté. Après émulsion totale, les échantillons sont centrifugés à 7500 rpm pendant 10 minutes à température ambiante. L'ADN est ensuite précipité par de l'isopropanol (0.6 vol/vol) pendant 1 h à température ambiante puis centrifugé à 10000 rpm pendant 30 min et rincé avec de l'éthanol à 80 %. Après centrifugation à 10000 rpm pendant 15 min, le culot est séché à l'air libre. L'ADN est ensuite dilué dans 200 μl d'eau milliQ Dnase - Rnase free et stocké à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant une nuit. La purification est une étape de nettoyage pour éliminer les molécules inhibitrices ou compétitrices. Elle est réalisée à l'aide du kit "*Wizard DNA clean-up System*" (PROMEGA).

1.2. Amplification de l'ADN extrait du sédiment

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

Les amplifications des ADN ont été réalisées en utilisant deux couples d'amorces. Le premier, 341f-GC et 518r spécifique des eubactéries, permet l'amplification d'un fragment de 235 paires de bases dans la région V3 du gène de l'ARN ribosomique 16S (Muyzer *et al.*, 1993). Le second, 567-FGC et 680R spécifique des *Vibrio*, permet l'amplification d'un fragment de 125 paires de bases du gène de l'ARNr 16S *Vibrio* (Eiler & Bertilsson, 2006; Thompson *et al.*, 2004b).

Les amplifications par PCR ont été réalisées dans un volume réactionnel de 50 µl comprenant de 20 à 100 ng d'ADN de sédiment, 0.2 mM de dNTPs, 4 mM de MgCl₂, 1 µM de chaque amorce universelle (Muyzer *et al.*, 1993) ou 0.5 µM d'amorces spécifiques des *Vibrio* (Eiler & Bertilsson, 2006; Thompson *et al.*, 2004b), 2 unités de Stoffel Fragment et 2 unités de *Taq* polymérase dans son tampon.

Les conditions des amplifications ainsi que les réactifs sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Conditions et réactifs des réactions PCR

Réactifs	Concentration du réactif	Volume du réactif	Concentration finale dans le tube
H2O milliQ stérile		Qsp 50 µl	
Tampon réactionnel	10x	5	1x
DNTP mix	10 mM chaque	1	0.2 mM chaque
MgCl ₂	50 mM	1.5	1.5 mM
Amorce forward	100 µM	0.5	1 µM
Amorce reverse	100 µM	0.5	1 µM
Taq DNA polymerase	5U/µl	0.4	2 U/50µl
Stoffel fragment (pour ADN du sédiment)	10U/µl	0.2	2U/50µl
ADN		20 à 100 ng d'ADN du sédiment (1 à 5 ng pour ADNg souche pure)	

Les amplifications ont été réalisées selon un programme spécifique dit « touchdown » (Murray *et al.*, 1996) modifié et adapté à nos amorces et dont les cycles sont présentés en annexe 2.

1.3.Migration électrophorétique DGGE

Après amplification, les fragments sont quantifiés par électrophorèse en gel d'Agarose 2 % par comparaison de l'intensité de fluorescence des ADN avec une gamme d'étalonnage constituée de

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

diverses concentrations d'ADN de sperme de saumon (Invitrogen). Environ 120 ng de produits PCR pour les amorces Muzer et 15 ng de produits PCR pour les amorces *Vibrio* sont ensuite déposés sur un gel contenant : une solution de polyacrylamide (acrylamide/ bis-acrylamide 37,5 : 1) à 8 %, un gradient linéaire de produits dénaturants de 40%-80% pour les amorces Muzer ou de 60%-80% pour les amorces *Vibrio*. Les gradients sont obtenus par dilution d'une solution mère à 100 % contenant du formamide (40 %) et de l'urée (7 Mm). Le temed (0,05 % ; p/v) et l'ammonium persulfate (0,05 % ; v/v) sont ajoutés dans la solution fille pour favoriser la polymérisation.

La séparation des bandes est réalisée pendant 18 h à 60°C et à 80V dans un tampon TAE 1X. Le gel est ensuite coloré pendant 30 min avec du SYBR gold (Invitrogen) avant d'être rincé pendant 15 min dans du tampon TAE 0,5X. Les bandes sont détectées par fluorescence aux UV à 532 nm (Typhoon 9400, Amersham).

1.4. Analyses et interprétations des gels

Un marqueur de position de bandes est déposé dans chaque extrémité des gels dans le but de pouvoir comparer les gels. Ce marqueur est composé de 4 bandes issues d'échantillons de sédiment ainsi que d'une bande correspondant à la souche 02/041 de *V. aestuarianus*, préalablement découpées et réamplifiées après électrophorèse. Grâce au marqueur, la comparaison de plusieurs gels est possible à l'aide du logiciel GelCompar II (Applied Maths, Kortrijk, Belgique). L'analyse nécessite de définir : les limites du gel et les différents profils à analyser, le bruit de fond, de normaliser les distances de migration des différents gels grâce au marqueur et de détecter les bandes sur chaque profil. Le logiciel permet de représenter chaque profil DGGE caractérisé par la présence ou l'absence de bandes (phylotypes) dont l'intensité est fonction de la représentativité du phylotype dans l'échantillon de départ. Chaque bande d'un profil est assignée dans une classe de sorte qu'une classe comporte toutes les bandes de tous les profils ayant migré à la même position. La matrice (Figure 30) qui en résulte comporte p lignes d'échantillons et n colonnes de variables (bandes) dont la valeur correspond à l'intensité relative de la bande dans le profil (la somme des bandes représentant 100%) permettant la comparaison des échantillons.

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

	A	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1		DGGE:27.5	DGGE:28.7	DGGE:29.3	DGGE:30.6	DGGE:31.5	DGGE:32.3	DGGE:33.8	DGGE:34.9	DGGE:36.1
2	A87 HT juin	0	0	0 8.25	0	0 15.34	5.95	0	0 6.79	0
3	A87 ST juin	0	0	0 8.15	0	0 14.77	7.48	0	0 5.38	0
4	A87 HT juillet	0	0	0 11.12	0	0 15.45	7.91	0	0 4.65	0
5	A87 ST juillet	0	0	0 11.56	0	0 28.94	7.88	0	0 3.04	0
6	A87 HT août	0	0	0	21 1.89	0	0 6.34	0	0 6.4	0.82
7	A87 ST août	0	0	0 16.6	3.02	0	0 1.03	0	1 10.75	4.58
8	A87 HT septembre	0	0	0 21.13	0	0 5.28	0	0 2.96	5.66	0.48
9	A87 ST septembre	0	0	0 18.21	0	0 7.08	0	0 2.69	6.08	0.53
10	RA7 HT juin	0	0	0 1.4	0	0 15.44	7.64	3.79	5.56	0
11	RA7 ST juin	0	0	0 12.85	0	0 31.86	0	0 3.55	7.98	0
12	RA7 HT juillet	0	0	0 27.44	0	0 2.78	6.61	2.23	0.66	9.04
13	RA7 ST juillet	0	0	0 17.34	0	0 25.05	5.55	4.23	13.21	0
14	RA7 HT août	0	0	0	0	0	0	0 12.93	0	0 15.4
15	RA7 ST août	0	0	0 36.37	0	0 4.28	6.36	12.51	0	0 18.23
16	RA7 HT septembre	4.27	0	0 32.11	0	0 9.66	9.04	0	0 13.91	0
17	RA7 ST septembre	1.36	0	0 33.96	0	0 4.94	10.3	0	0 11.23	0
18	A36 ST Février	0	0	0 16.04	0	0 6.63	8.51	0	0	0
19	A88 ST Mars	0	0	0 24.22	3.58	0	0 6.22	0	0 5.5	2.55
20	A88 ST Mai	0	0	0 6.79	0	0	0 4.77	0	0 4.24	4.77
21	A88 ST Juin	0	0	0 13.5	0	0	0 4.41	0	0 1.4	4.5
22	A88 HT Février	0	0	0	0 5.53	0	0 0.86	0	0 3.8	4.27
23	A88 HT Mars	0	0	0 12.58	0	0	0 8.85	0	0 5.5	5.51
24	A88 HT Mai	0	0	0 1.14	0	0	0 9.85	0	0 1.42	6.88
25	A36 HT juin	0	0	0	0	0 7.41	8.66	8.54	1.21	3.48
26	RA8 ST janvier	0	0	0 3.80	4.86	0	0	0	0 1.8	0

Figure 30 : exemple de matrice générée avec le logiciel Gelcompar

Cette matrice est ensuite utilisée pour le traitement statistique des données. Ainsi, grâce au logiciel Primer 5 (PRIMER-E Ltd Plymouth UK), on génère une matrice de similarité avec le test de Bray-Curtis couramment utilisé en écologie (Clarke, 1992; Clarke & Warwick, 2001). Cette matrice permet également d'établir une représentation MDS (Multi-dimensional-Scaling). Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant l'Anosim et la corrélation de rang de Spearman.

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

1.5. L'étude des communautés bactériennes totales

L'étude des communautés bactériennes totales a été réalisée à l'aide de couple d'amorces universelles des eubactéries. Une fois les profils générés, ils ont tout d'abord été comparés par une analyse visuelle qui est fréquente dans la littérature (McBain *et al.*, 2003; Tannock, 2002). Toutefois, cette analyse est rendue difficile par la complexité des profils des sédiments. Il existe des méthodes d'analyses multivariées qui permettent de comparer plusieurs profils (Ramette, 2007). Nous avons choisi le MDS (Multidimensional Scaling) ou le positionnement multidimensionnelle qui est une méthode d'analyse courante en écologie. Ainsi, l'homogénéité des populations bactériennes pour un site de prélèvement donné a été testée en comparant les profils de DGGE des triplicats (échantillons de 2007) et des quadruplicats (échantillons de 2008). Nous avons 4 gels (32 profils) pour un site donné soit au total 8 gels pour 64 profils. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test de Bray Curtis et un test non-paramétrique, l'Anosim. Il teste les différences significatives entre les profils en se basant sur la dissimilarité qui les séparent (Clarke, 1992). Il compare la dissimilarité entre groupes avec la dissimilarité à l'intérieur d'un groupe. La valeur de R donnée par le test statistique indique l'importance de la différence (R est compris entre 0 et 1 et plus R est élevé moins les groupes sont différents) et la valeur de p indique le seuil de significativité de cette différence.

1.6. Construction de banques de clones environnementaux et analyse des séquences

Le clonage a été réalisé à partir des bandes DGGE obtenues sur les amplifrons ADNr 16S (eubactériens) des échantillons de l'Aber Benoît et de la rivière d'Auray et des amplicons ADNr 16S spécifiques des *Vibrio* des échantillons de l'Aber benoît. Des bandes ont été choisies selon le critère présence/absence, puis en fonction de leur intensité. Ces bandes ont été découpées du gel et réamplifiées avec les mêmes jeux d'amorces. Elles ont subi une deuxième séparation par DGGE afin de s'assurer qu'il s'agit bien d'une seule et unique bande.

Les produits PCR ont été clonés dans le plasmide TOPO TA à l'aide de la T4 DNA ligase selon le protocole du fournisseur (Invitrogene). Les cellules d'*E. coli* DH5 α ont été transformées à l'aide du plasmide par la méthode du choc thermique. Les cellules transformées ont été étalées sur du milieu LB Agar additionné d'ampicilline (en présence ou non de X-gal). Le criblage a été réalisé par amplification par PCR des fragments du plasmide à l'aide d'amorces spécifiques en utilisant les clones positifs. Ces clones ont été mis en culture 20 h dans du LB additionné d'ampicilline, centrifugés et les culots ont été envoyés pour le séquençage. Les séquences obtenues ont été analysées dans la banque de données NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

2. Résultats et discussion

L'un des plus grands enjeux en écologie microbienne est de déterminer la diversité bactérienne ou la structure de la communauté bactérienne présente dans un environnement donné. Il est important de comprendre les changements qui peuvent survenir dans la diversité ou la structure d'une communauté au cours du temps ou sous l'influence d'une perturbation. Dans ce travail, nous avons étudiés les variations de la communauté bactérienne au cours du temps et en fonction du site de prélèvement dans les sédiments de l'aber Benoît et de la rivière d'Auray. Pour chacun de ces sites, les points d'échantillonnage étaient situés sous les tables ostréicoles, et à proximité, afin d'étudier les effets de la présence des huîtres. Afin de caractériser finement les communautés bactériennes, nous avons employé les techniques récentes de la biologie moléculaire. Nous avons effectué pour chaque échantillon de sédiment une analyse de la structure génétique de la communauté bactérienne totale par DGGE, par l'amplification du gène de l'ARNr 16S de l'ADN total extrait des sédiments. Les amorces utilisées sont soit spécifiques de l'ensemble des eubactéries, soit spécifiques du genre *Vibrio*. L'avantage principal de cette technique récente d'analyse de la diversité bactérienne est qu'elle prend en compte aussi bien la part cultivable que la part non-cultivable de la communauté. Il faut noter toutefois que les phylotypes mis en évidence représentent les espèces les plus abondantes : comme nous l'avions mentionné dans les données bibliographiques, certains gènes de l'ARNr 16S sont présents dans les sédiments mais en faible concentration et ne seront donc pas suffisamment amplifiés pour être visibles sur les gels. Dès lors, les bandes qui sont visibles sur les gels dans cette étude, sont le reflet du gène de l'ARNr 16S des espèces les plus abondantes dans les sédiments pour une date donnée.

2. 1. Les populations de *Vibrio*

Les espèces du genre *Vibrio* représentent le groupe bactérien le plus fréquemment observé lors des mortalités estivales de *C. gigas*. Le but de ce travail est de déterminer en premier lieu la diversité de cette population, puis d'étudier l'effet de la présence des huîtres sur cette communauté et de vérifier la présence d'espèces pathogènes. Pour ce faire, nous avons réalisé, des profils DGGE à l'aide d'amorces spécifiques de ce groupe bactérien. Ces amorces ont été utilisées pour la première fois dans une étude de la variation des populations des *Vibrio* selon les saisons dans les eaux côtières de l'Atlantique Nord (Thompson *et al.*, 2004b). Plus tard, ces amorces ont été utilisées par Eiler et Bertilsson (2006) pour détecter les espèces *Vibrio* à l'aide de la DGGE. Nous avons testé plusieurs gradients, et le gradient 60% - 80% semblait le mieux adapté pour la séparation de différentes

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

espèces. Les résultats des profils DGGE obtenus sur les échantillons de sédiment de l'année 2007 ont montré que la population des *Vibrio* était très peu diversifiée. En effet, les sédiments étaient composés en moyenne de 2 bandes dominantes dont les intensités variaient très peu (Figure 31).

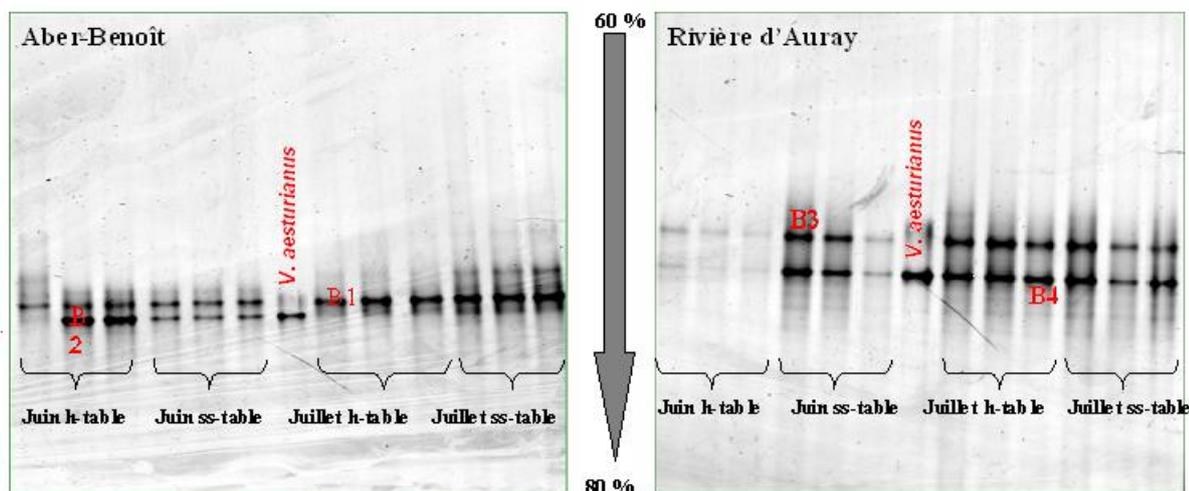


Figure 31 : Photos de gel DGGE représentant les profils des populations de *Vibrio* dans les sédiments collectés sous table et en dehors des tables à l'Aber-Benoît et à la Rivière d'Auray en 2007. Les 4 bandes notées B1 à B4 sont les bandes dominantes dans les sédiments des deux sites.

L'analyse des séquences de ces différentes bandes ont montré que les espèces bactériennes affiliées sont très diverses. La bande 1 a 98 % de similarité avec une souche environnementale de *Vibrio*, *V. tasmaniensis*, et 91 % avec *Aliivibrio fischerii*. La bande 3 a 98 % de similarité avec *V. splendidus*, et *V. cyclithrophicus*. Les bandes 2 et 4 qui ont migré à la même position que la bande correspondant à *V. aestuarianus* 02/041, et possède 98 % de similarité avec *V. aestuarianus*, *V. shinollii*, *V. mediterranei* et une souche environnementale de *Vibrio*. Une co-migration des bandes a été observée par ailleurs (Eiler & Bertilsson, 2006). Chaque bande représente dès lors un ensemble d'espèces de *Vibrio* et non une seule une espèce. Dans leur étude, Eiler & Bertilsson (2006) ont utilisé le terme population pour désigner un ensemble d'espèces dont la séquence migre à la même position. Ainsi, la population 6 par exemple est composée de *V. aestuarianus* et d'autres espèces du genre. Compte tenu de ce résultat et de la taille des fragments (<125 bp) qui fournissent très peu d'informations phylogénétiques, nous n'avons pas poursuivi l'analyse spécifique par DGGE de ce groupe bactérien pour l'année 2008.

2.2. Les populations de bactéries totales

Par l'analyse visuelle des profils obtenus par DGGE dans les sédiments, en utilisant les amorces universelles pour eubactéries, nous avons noté que les profils (triplicats) issus du même

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

sédiment (3 carottages) pour une date donnée sont pratiquement identiques (Figure 32). Ainsi, au mois de juin, les 3 profils DGGE de sédiments collectés sous les tables à l'aber Benoît sont similaires mais sont différents des profils de sédiments collectés en dehors des tables. On peut observer le même schéma pour les échantillons issus de la rivière d'Auray.

L'analyse visuelle suggère également un effet lié à la présence des poches d'huîtres puisque certaines bandes sont spécifiques, pour un site et une date donnée, des conditions « hors table » et « sous table ». Néanmoins, en considérant tous les profils de tous les mois pour un site donné, l'analyse visuelle a montré que chaque bande est présente au moins une fois dans le sédiment sous table et le sédiment hors table à l'exception de 2 bandes en février et mars sur les échantillons de la rivière d'Auray.

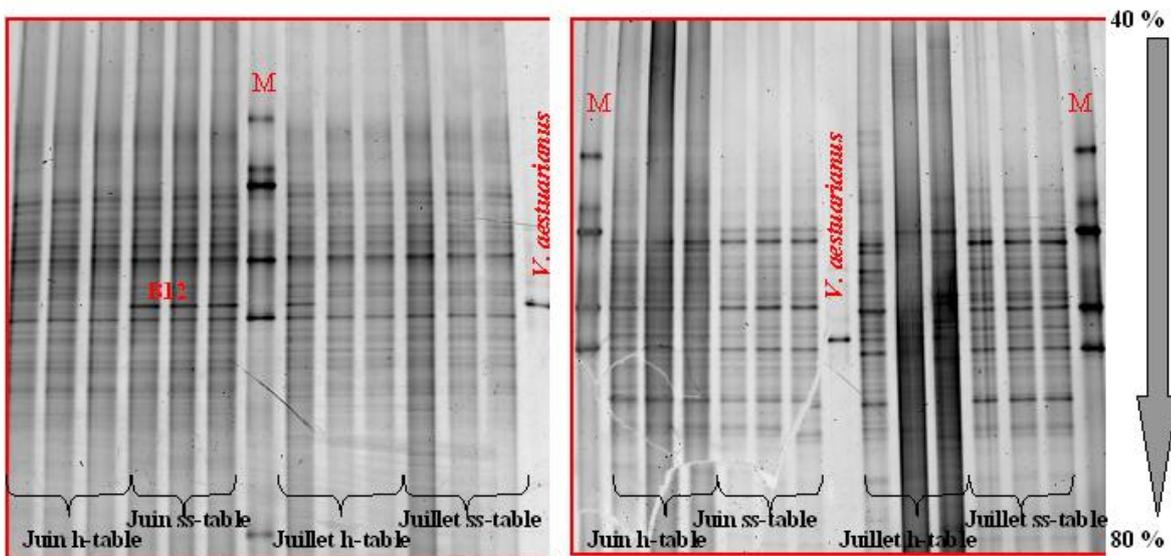


Figure 32: Photos de gels DGGE des échantillons prélevés au cours des quatre mois de l'été 2007 dans la rivière d'Auray, correspondant aux profils (Tripliquats) des échantillons prélevés en dehors des tables et ceux prélevés sous les tables

Les premiers tests statistiques ont montré un effet significatif lié au gel. Par conséquent, chaque gel a été traité séparément. Puisque chaque gel ne montrait que les profils pour un seul site et deux mois d'échantillonnage, les seuls effets testables étaient les effets réplicats, comparaison hors-table et sous-table pour un même site, et un effet date par comparaison par paire de 2 dates d'échantillonnages consécutifs (juin versus juillet par exemple).

Les représentations MDS réalisées à partir des profils de chaque gel montrent que les triplicats et quadruplicats issus des prélèvements sous table sont similaires entre eux et différents des autres triplicats ou quadruplicats issus des prélèvements hors-table. Les résultats de l'Anosim montrent que cet effet de la présence des huîtres sur la composition bactérienne du sédiment est variable selon les

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

sites, et les dates. L'analyse de similarité de Bray-Curtis a montré un effet significatif lié à la présence des tables d'huîtres dans la Rivière d'Auray, aux mois de juin ($R=0,815$, 10%), août ($R=0,593$, 10%) et septembre 2007 ($R=1$, 10%), février ($R=1$, 10%) et mars 2008 ($R=1$, 10%). De la même manière, on observe un effet de la date d'échantillonnage sur la diversité des communautés mais cet effet est variable selon les dates et les conditions considérées. Par exemple, la comparaison des profils pour une même condition (hors table ou sous table), montre un effet date significatif entre juin et juillet (hors tables : $R=0,519$, 10%, sous tables : $R=1$, 10%) et entre août et septembre mais dans ce cas uniquement pour la condition « sous tables » (hors tables $R=0,407$, 20%, sous tables $R=0,667$, 10%). Ceci traduit par un effet d'interaction entre la date de prélèvements et la condition.

Dans l'aber Benoît, l'effet de la présence des tables est significatif au mois de juin 2007 ($R=0,926$, 10%), février 2008 ($R=0,656$, 2,9%). L'effet date montre la même interaction avec l'effet de la condition qu'en rivière d'Auray : une différenciation significative apparaît entre juin et juillet pour les deux conditions (hors tables $R=0,926$, 10%, sous tables $R=1$, 10%). Toutefois, ces différenciations entre dates d'échantillonnage peuvent ne s'exprimer que pour une condition donnée, ainsi, entre février et mars 2008, on observe une structuration des communautés différente hors tables, mais pas sous tables (hors tables $R=0,771$, 2,9%, sous tables $R=-0,052$, 54%).

2.3. Relation entre communauté bactérienne et les caractéristiques chimiques du sédiment

Dans un premier temps, nous avons testé la covariation entre les valeurs de température, les flux d'ammonium, de phosphore et de nitrates par des tests de corrélations. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'analyse de l'effet de ces facteurs sur la structuration des communautés bactériennes dans nos sites d'étude, d'après les résultats des analyses MDS. Les analyses en test de corrélation de Spearman montrent des covariations significatives, et positives dans seulement 3 cas (Figure 33). La température et le flux de nitrates ($R=0,713$, $P < 0,05$) et les flux de phosphore et d'ammonium sont positivement corrélés entre eux à l'Aber-Benoît ($R=0,808$, $P < 0,05$). A la Rivière d'Auray, la corrélation est significative est là-encore, positive uniquement entre les flux de phosphore et d'ammonium ($R=0,639$, $P < 0,05$).

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

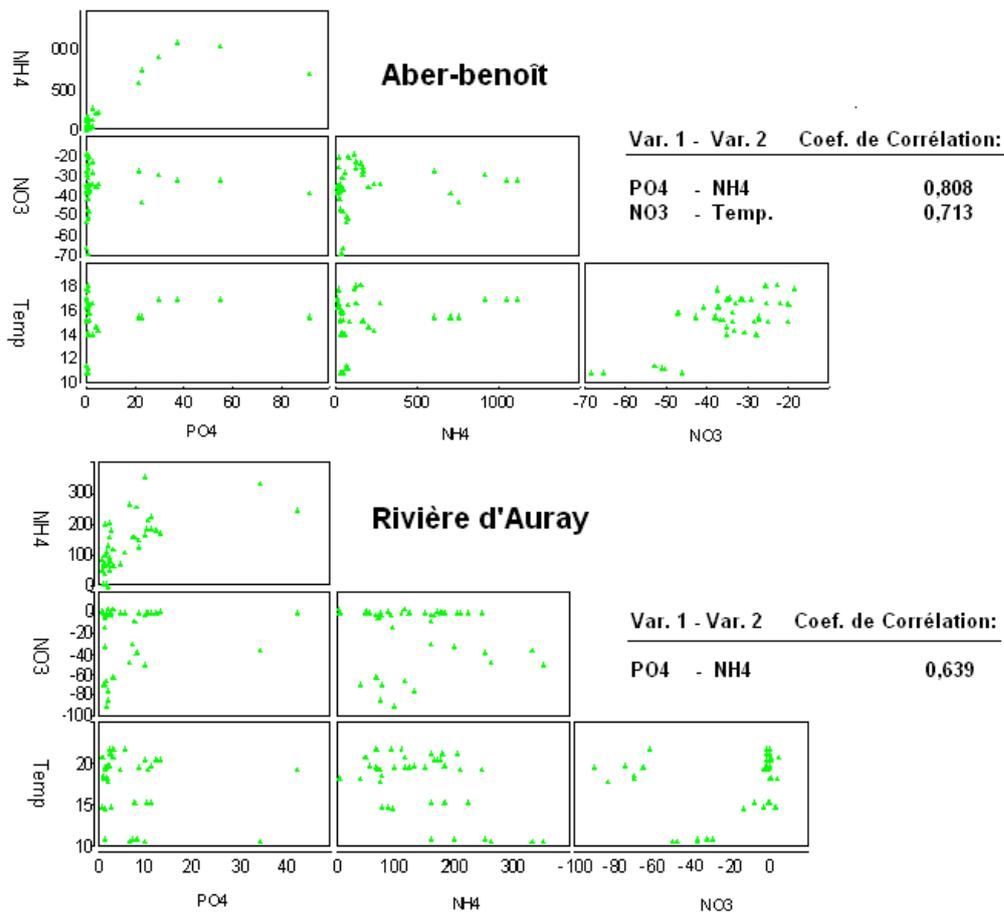


Figure 33 : Graphiques de corrélation entre les différents paramètres des sédiments à l'aber Benoît et en rivière d'Auray. Les coefficients de corrélations pour les corrélations significatives sont indiqués sur le graphe

Les variations des différents facteurs environnementaux ont été comparées à chacun des profils des 8 gels. Dans cette section, ne seront présentées que les résultats relatifs aux corrélations significatives détectées lors de cette analyse. A l'aber Benoît, un effet significatif de la température est détecté sur les profils DGGE des mois de juin à juillet 2007 ($Rho = 0,325$, $p = 0,018$) et avec l'ensemble des profils de 2008 ($Rho = 0,139$, $p = 0,06$) (Figure 34). Sur ce même site on observe une corrélation entre les flux de nitrates pour les profils des mois de juin et juillet 2007 ($Rho = 0,198$, $p = 0,083$) et pour les profils des mois d'août et de septembre 2007 ($Rho = 0,413$, $p = 0,03$) (Fig. 5). En rivière d'Auray la température et les flux de nitrate sont corrélés avec les profils des mois de juin et juillet 2007 (température : $Rho = 0,307$, $p = 0,066$; Nitrate : $Rho = 0,213$, $P = 0,046$) alors qu'aux mois d'août et

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

septembre 2007, les profils sont corrélés aux variations des flux de nitrates ($Rho = 0,398$, $p = 0,001$) et de phosphates ($Rho = 0,412$, $p = 0,032$) (Figure 35).

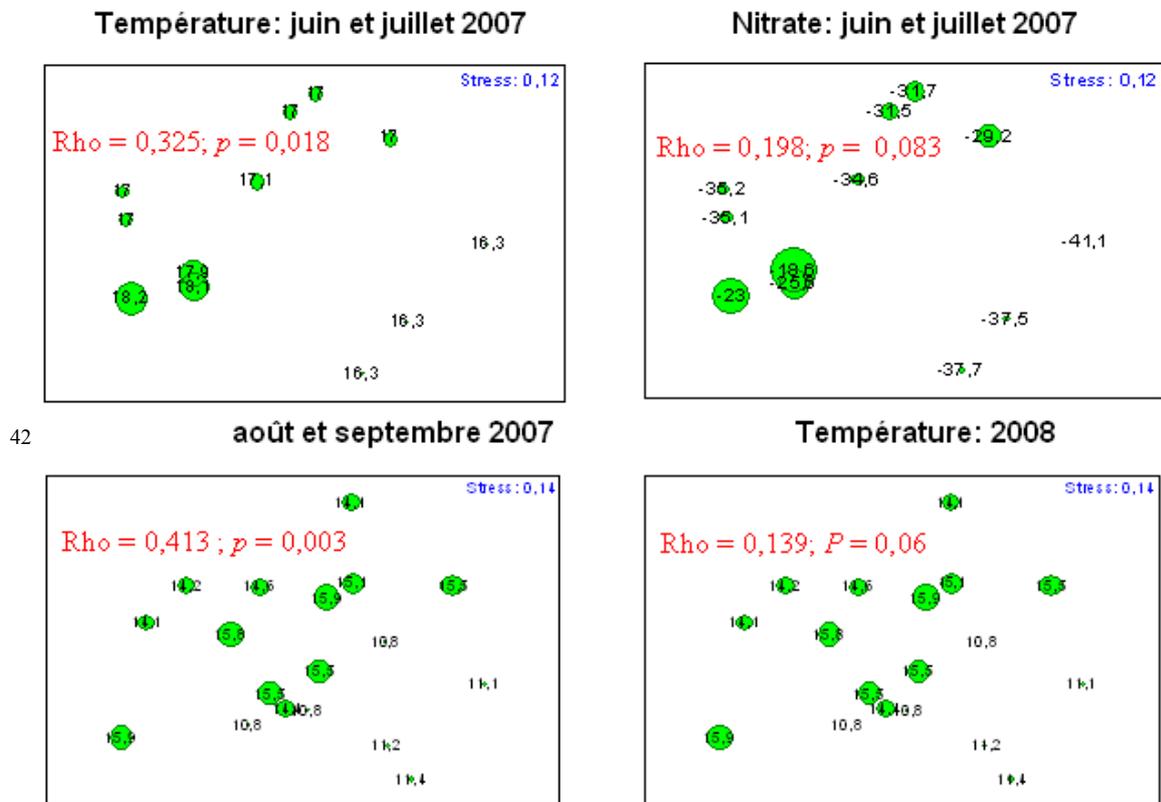


Figure 34: MDS de l'influence de la température et du flux de nitrates sur la structure de la communauté bactérienne du sédiment de l'aber Benoît aux mois de juin à septembre 2007 et en 2008 (le diamètre des cercles étant proportionnel à la valeur de la variable représentée)

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

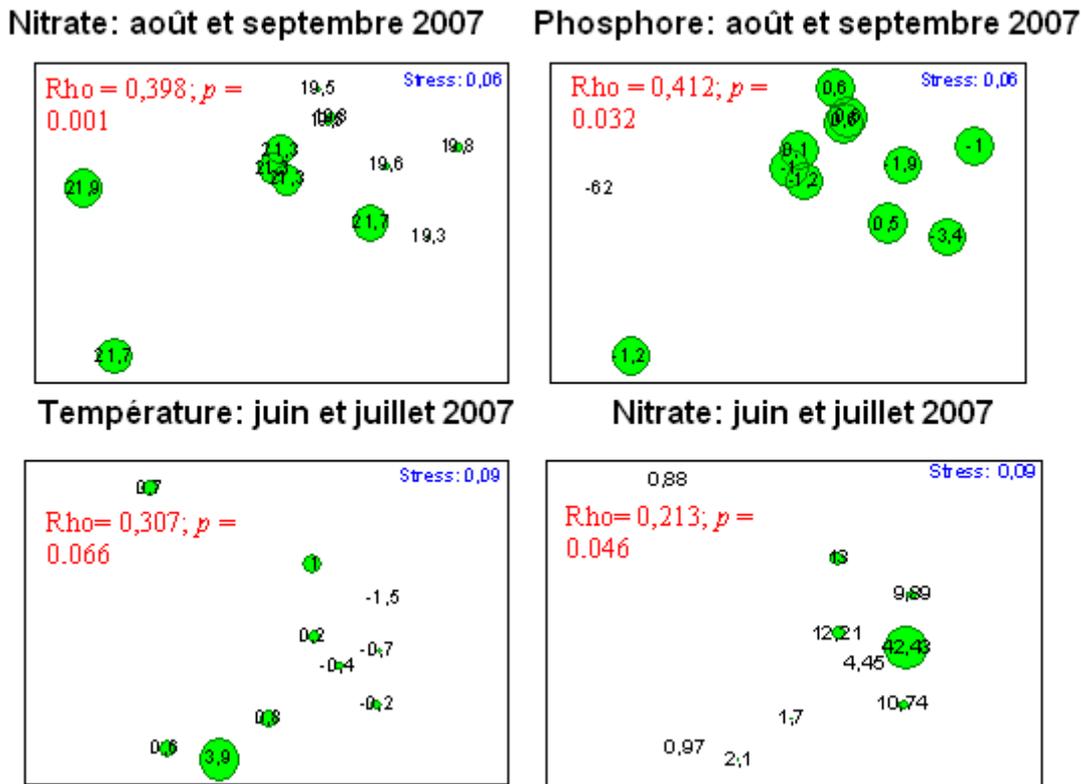


Figure 35 : MDS de l'influence de la température et du flux de nitrates sur la structure de la communauté bactérienne du sédiment de la Rivière d'Auray aux mois de juin à septembre 2007 (le diamètre des cercles étant proportionnel à la valeur de la variable représentée)

2.4. Phylogénie des communautés bactériennes des sédiments

Afin d'identifier les espèces affiliées aux différentes bandes présentes dans les profils, nous avons repéré les bandes communes à tous les sites de prélèvements pour toutes dates confondues, puis les bandes spécifiques à chaque site et à chaque date. En regroupant les profils sur tous les sites et à toutes dates confondues, à l'aber-Benoît de même qu'en rivière d'Auray, il apparaît que chaque bande est présente au moins une fois dans les échantillons de sédiments prélevés sous les tables et en dehors des tables et que seules les intensités varient en fonction de la saison et du site. Par exemple en rivière d'Auray, la bande que nous avons nommé B12, est présente durant tous les mois dans les échantillons prélevés sous les tables avec une intensité constante. A l'inverse, à l'aber Benoît, sa présence et son intensité dans les échantillons prélevés sous les tables ou en dehors des tables, varient en fonction de la date de prélèvement. La distance de migration de cette bande est semblable à celle de la bande de *V. aestuarianus*.

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

Au total 19 (80 clones) et 23 (92 clones) bandes ont été séquencées respectivement pour les sites de l'aber Benoît et rivière d'Auray. Les séquences correspondantes sont disponibles dans la banque de données EMBL sous les numéros d'accessions FN555177 – FN555194 et FN555208 – FN555229. Les différentes séquences sont apparentées à sept groupes bactériens soit, α , δ , et γ -*Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia* et *Bacilli*. Dans l'ensemble la plupart des membres à l'intérieur de ces groupes sont non cultivés (Cf. article 1). Certaines des bandes correspondent à des espèces du genre *Vibrio* telles que *V. ordalii* qui est un pathogène de poisson et *V. aestuarianus*, pathogène de *C. gigas*. Dans l'ensemble, les espèces identifiées ont été toutes déjà décrites comme appartenant à des communautés des environnements marins, estuariens ou côtiers (Jensen *et al.*, 2007; Kawahara *et al.*, 2009; Lasher *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2009). Des bandes correspondant à des séquences de la famille des Bacilli ont été exclusivement retrouvées en rivière d'Auray. Les membres de ce groupe sont ubiquitaires des habitats terrestres et des eaux douces. Ils peuvent être également retrouvés dans les eaux marines (Parvathi *et al.*, 2009; Ruger *et al.*, 2000). La détection de séquences de ce groupe principalement en rivière d'Auray suppose l'influence d'apports terrigènes dans cet environnement. Néanmoins, le nombre de répliquats de sédiment et de bandes séquencées qui ont été analysés ne permettent pas de tirer une conclusion quant à la présence ou non d'un groupe sur l'un ou l'autre des sites.

Conclusion

L'objectif du travail de ce chapitre était : i) de déterminer la structure génétique des communautés bactérienne des sites d'études et l'effet de la présence des tables d'huître creuse *Crassostrea gigas* ii) de déterminer les relations avec certains paramètres environnementaux et la structure des communautés bactérienne iii) de vérifier la présence de potentiels pathogènes tels que les bactéries du genre *Vibrio*.

Pour cette étude, nous avons utilisé la séparation de fragments du gène de l'ARNr 16S par électrophorèse en gradient dénaturant. Nous avons ciblé la population bactérienne totale ainsi que la population des bactéries du genre *Vibrio*.

Les amorces utilisées pour caractériser la structure des populations de *Vibrio* n'ont pas permis de séparer convenablement les espèces à l'intérieur du genre. De fait, les bandes représentées étaient très peu diversifiées avec deux bandes dominantes qui variaient très peu. L'analyse des séquences a montré la co-migration entre plusieurs espèces, une bande correspondant à 2 ou 3 espèces. Toutefois, nous avons noté la présence d'espèces *V. splendidus* et *V. aestuarianus* qui sont des pathogènes de *C*

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

gigas. Cependant la petite taille du fragment amplifié permet une identification du genre, mais ne permet pas d'exploiter cette donnée pour une analyse phylogénétique plus détaillée.

La structure de la communauté totale a montré une diversité comparable à celle d'autres sédiments de zones intertidales. Il semble que la présence des tables ostréicoles (voir le chapitre 1) influence peu la structure et la composition de la communauté bactérienne totale dans l'aber Benoît. En rivière d'Auray où l'effet de la présence des huîtres est moins prononcé sur les facteurs physico-chimiques, la variation de la structure des communautés bactériennes entre les sédiments sous tables et hors tables est plus importante qu'en aber Benoît, ainsi que le montrent les analyses en Bray-Curtis. La plupart des phylotypes identifiés correspondent à des séquences observées dans d'autres études dont certains sont apparentés à des espèces cultivées. La température ainsi que les flux de nitrates sont les facteurs qui expliquent en priorité la distribution spatio-temporelle des communautés bactériennes des sédiments dans l'aber Benoît. En rivière d'Auray ce sont la température, les flux de nitrates et de phosphate qui expliquent la variabilité de la structure génétique des communautés bactériennes. Nos résultats montrent que la présence des tables d'huître a probablement un effet relativement indirect sur la structure de la communauté bactérienne des sédiments. Comme nous le mentionnions dans le chapitre précédent, les huîtres contrôlent probablement en partie l'activité microbienne par l'intermédiaire de la biodéposition qui augmente globalement la quantité de matière organique à proximité des tables. Toutefois, nous avons également observé que l'effet de la présence de poches d'huîtres sur la variation des concentrations des espèces chimiques dans le sédiment différait également entre les sites étudiés. D'après ces résultats il semblerait que les variations de la structure des communautés bactériennes soit dues à une interaction complexe entre la variabilité des flux de matière organique entrant, et la variation de l'efficacité des processus de minéralisation, ces deux termes étant chacun influencé par les caractéristiques propres à chaque site.

Cette étude a aussi permis de mettre en évidence la présence de pathogène tels que *V. ordalli* et *V. aestuarianus*. Dans la mesure où les bandes visibles sur un gel de DGGE sont des séquences des espèces dominantes d'un milieu, nous pouvons dire que cette bactérie fait partie des espèces dominantes des sédiments de l'aber Benoît et de la rivière d'Auray.

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

3. Article 1 (*in prep*) : Impact of oyster activities on sediment bacterial structure in two farms in France

Afi Azandégbé ¹, Franck Poly ³, Françoise Andrieux-Loyer ², Roger Kérouel ² Xavier Philippon ², Jean-Louis Nicolas ¹

1 Ifremer, Laboratoire de physiologie des Invertébrés, PFOM, Centre de Brest BP70. 29280 Plouzané, France

2 Ifremer, Laboratoire Dyneco Centre de Brest BP70. 29280 Plouzané, France

3 Microbial Ecology Center University of Lyon 1, 16 rue Dubois 69622 Villeurbanne France

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

Abstract

Bacterial community structure and some sediment factors were studied from June 2007 to May 2008 in sediment of two oyster farming sites in Brittany (France), Aber Benoît and Rivière d'Auray to know the ecological impact of oysters on sediment. Sediment samples collected 50 cm above the oyster tables were compared to sediment of control at 30 m apart from the table. Bacterial community structure was analysed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) on sediment total DNA using partial amplification of eubacterial 16S rRNA gene. Interesting bands were characterized by cloning and sequencing. Ammonia, sulphide, nitrate and phosphate were measured and their diffusive fluxes from sediment were calculated.

Results revealed a high diversity in microbial community composition of both sites. However it remains globally stable through the year. From microbial community structures, statistical analysis using Anosim showed that even if it trended to exist, the effect of oyster biodeposit on bacterial structure was not proved. Benthic fluxes of ammonia and sulphide due to the decomposition of biodeposit were much more intensive under the oyster table than control station. The temperature was the main factor influencing the structure of the bacterial community in both farms. Ammonia, nitrate and phosphate had punctual influence.

The bacterial groups identified are commonly found in intertidal and marine sediments. *Gammaproteobacteria* is the most represented and included members of the *Vibrionaceae*, such as *Vibrio aestuarianus*: a known pathogen of *Crassostrea gigas*. *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, and *Acidobacter* classes were also represented. However, no bacterial group distinguished the control from the oyster samples but the species were different between farms.

Keywords: Bacterial community structure, physicochemical parameters, sediment, oyster

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

Introduction

Oysters farming mainly the production of the species *Crassostrea gigas*, is an important economical activity in France. One hundred thirty thousand tonnes of oysters are produced per year and the activity yields about 25 millions euros per year. With this production rate France is at the first place in Europe and the fourth in the world. However since the ninetieths, this activity is encountering some economical troubles due to the summer mortalities of *C. gigas*. In a framework of a multidisciplinary research aimed to solve the problem, the analyses highlighted multiple factors including the genetic and physiological status of the oysters, the water temperature, the algal food, pathogens and the sediment (Samain & McCombie, 2008). Indeed, it has been demonstrated that mortalities rate increased with the proximity of the sediment. The occurrence of the mortalities was often concomitant with the flux of toxic compounds such hydrogen sulphides and ammonium from the sediment. However, the involvement of sediment in the appearance of the mortalities might be an indirect consequence of the impact of the oyster farming activities itself on the sediment. Yet early Susumu and Takeo (Susumu & Takeo, 1955) had demonstrated how the intensive oyster culture can modify the bottom sediment and how in turn the modified sediment can interfere with the lives of oysters physiology. In their study made at a Katsurashina oyster farm in Japan, they conclude that the bottom sediment below the oysters rack was highly polluted with organic matter due to biodeposition and that it contained high percentage of fine particle, total nitrogen, sulphide and ammonia which are knew to be toxic to macroorganisms. Furthermore in another study conducted in Etang de Thau (South of France) characterised by a semi-intensive culture of oyster, the analysis of benthic fluxes of inorganic nutrients and oxygen at the water-sediment interface have showed that the fluxes of ammonia and oxygen were respectively 1-5 and 1.8-3 times higher under the oyster tables station than outside the tables (Mazouni *et al.*, 1996). These fluxes were due to the high

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

mineralisation of the organic matter in the sediment. (Deslous-Paoli *et al.*, 1996) noticed the same differences and recorded high concentration in organic matter in the upper surface (0-5 cm) of oyster farming sediment. Bacteria are mainly responsible of the degradation of the organic matter in the aquatic environment (Kemp, 1990), which leads to inorganic forms such as NH₃, hydrogen sulphide (H₂S). Moreover they can promptly response to organic matter input, by changing their activities, it is likely that the biodepositions of oysters can impact their population in the bottom sediment. The bacterial community of estuarine and coastal sediment has yet been studied by molecular and cultivation methods but little is known about the bacterial community of oyster farms sediments and about the impact of biodepositions from oysters pseudo-faeces and faeces on bacterial community shift.

Here we conducted, a two years study in two oyster farms in France to study the impact of oyster farm activities on the microbial population of the sediment.

Materials and methods

Sites description

The sampling has been conducted in the upstream part of Rivière d'Auray (Fig.36) at oyster culture site named Fort-espagnol, (2°58'O and 47°36'N) and in the downstream part of Aber-Benoît (4°36'O and 48°36'N), two estuarine area in France where oyster culture is highly developed.. The Aber Benoît (Fig.1) is a river of 8 km long situated in the Northwest of Finistère in (Brittany). The average flow in water is about 0,418 m³/s. The big part of the river is a basin with 12 km length and 14 km² of surface and is opened on the sea. The site under investigation is located downstream where there are more influences of ocean water. The two sites are subjected to the terrestrial influences through catchments areas of moderate surface and are convenient to the breeding of oysters thanks to the presence of phytoplankton blooms.

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

The estuarine area of Auray represents the west part of the Gulf of Morbihan in south Brittany. This estuary is bordered in its upstream part with mud bank. It is influence with anthropogenic activities mainly agriculture which is provided by the catchment areas (800 m²) which two principal rivers the Loch and the Sal flow into Rivière d'Auray. The tidal flux generates a renewal of 50 % of the Gulf's water every 10 days (20 tides). Its downstream part is devoted to ostreiculture activities.

Aber Benoît is characterized by muddy-sandy (table1) sediment and Rivière d'Auray sediment is sandy-mud and was colored black (Table 2). The sediment of Aber-Benoît also was black under the tables but was stained slightly green on top. These sediments were also characterized by high mean values of total carbon.

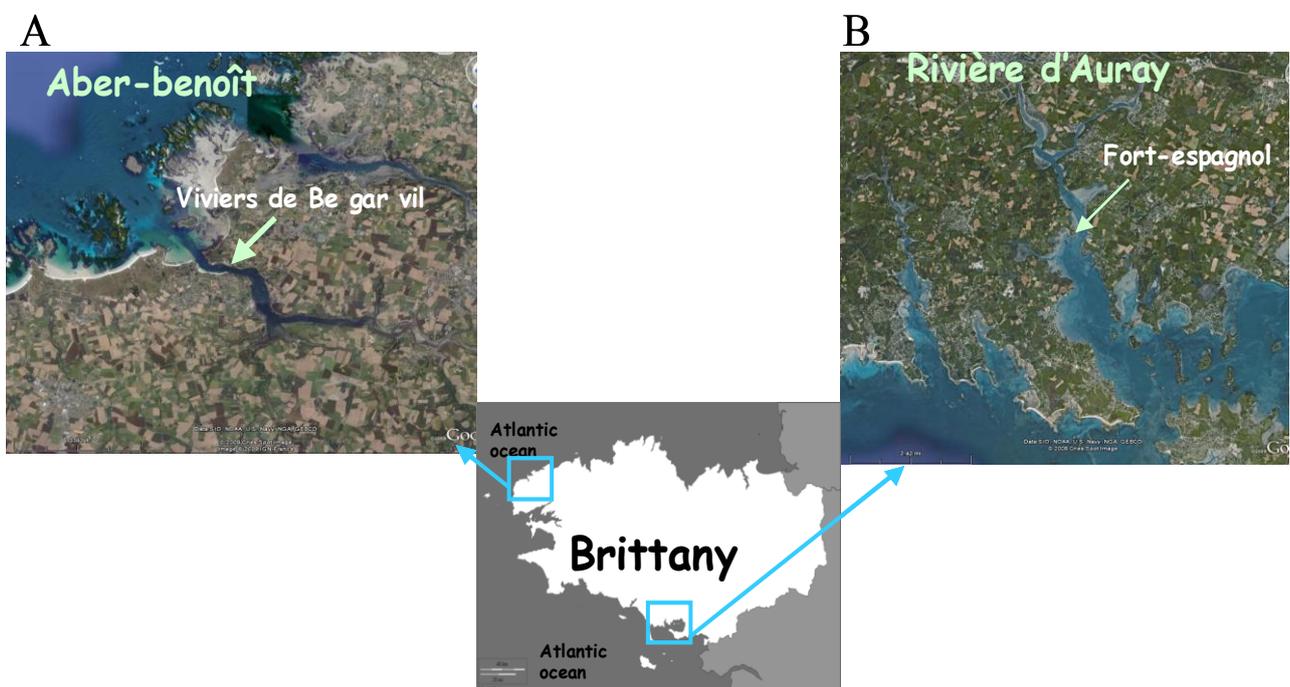


Figure 36. Representation of Aber-Benoît (A) Rivière d'Auray in the golf du Morbihan (B). Locations of sampling sites are indicated by arrows.

Samples collection

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

Sediment samples were collected on a monthly basis from June 2007 to September 2007. In 2008, other samplings were done in February, March, May and June. On each site, 3 bags containing 250 oysters were laid on tables 50 cm above the sediment. To better understand the oyster culture impact, two stations were chosen: the table station (OS) 50 cm beneath the tables and the control station (C) 30 m far from the tables. For bacterial structure analysis, 3 replicates sediment samples of 5 cm were collected manually with polypropylene tubes. In 2008, 4 replicates were collected per site. Every sample was homogenised and stored at -80°C until analysis. The sediment and its overlying water for physico-chemical analysis were collected by hand corer using PVC cores (id = 9 cm ; h = 30 cm). Any disturbance of the sediment-water interface was carefully avoided.

DNA extraction:

The DNA was extracted from 5 g of sediment according to the SDS-based lysis of (Zhou *et al.*, 1996) and was suspended in 500 μl of sterile deionised water. Finally, the DNA was purified with Wizard® DNA Clean-Up System (Promega, Madison) according to the manufacturer instructions and was diluted to 10 ng/ μl for PCR amplification.

PCR amplification and DGGE analysis

The primers 341f-GC (5'-GC-clamp-CCTTACGGGAGGCAGCA-3') and 518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') were used to amplify a 230-bp fragment of the V3 region of the bacterial 16S rRNA gene. A 40-base-pair GC-clamp (CGCCCGCCGCGCGGGCGGGGGCACGGGGGG) was attached to the 5' end of the forward primer (Muyzer *et al.*, 1993). The reaction mixture contained 1 μM of each primer, 2 mM of MgCl_2 , 0.2 mM of each deoxynucleotide triphosphates and 1 U AmpliTaq DNA polymerase (Invitrogen, life technologies) with 1x of its buffer in appropriated milliQ water for a final volume of 25 μl .

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

PCR cycle was carried out in a thermocycler (My Cycler™ thermal cycler, Biorad, USA) using the touch-down program as described elsewhere (Murray *et al.*, 1996) with slight modifications: Initial denaturation at 94°C for 3 min, following by 10 cycles with denaturation at 94°C for 30s, and touchdown annealing from 65°C to 56°C for 30 s. The annealing temperature decreased 1 °C for each cycle. The annealing temperature was settled at 55 °C for the 20 cycles and primer extension was down at 72°C for 30s. The final extension was run at 72°C for 30 min to decreased the non-specific amplification according to (Syvyk *et al.*, 2008) prior to cooling at 4°C.

PCR products were loaded onto 8 % (w/v) polyacrylamide gel cast in 1x TAE (40mM Tris, 20 mM acetic acid, 1mM EDTA, pH 8.0). The polyacrylamide gels were made with denaturing gradient ranging from 40 to 80 % for eubacterial primers with 100% denaturing contained 7 M urea and 40 % deionized formamide. DGGE was carried out with the D-code DGGE system (Bio-Rad laboratories, France). Electrophoresis was conducted in 1 x TAE buffer at a constant voltage of 80 V and a temperature of 60°C for 18 h. After electrophoresis, gels were stained with Sybr-gold diluted at 1/10000 for 30 min, rinsed with 0.5x TAE for 15 min and fluorescence was revealed at 540 nm using a fluorimager (typhoon 9400, amersham) and the images obtained were analysed with Gelcompare II tool. The DGGE bands were detected with the software and the presence/absence and intensities of bands were used in the similarity analyses.

Sequencing and phylogenetic analysis of DGGE bands

The interesting DGGE bands were excised from gels, reamplified and presence of an individual band was verified by a second DGGE electrophoresis. Four band positions were frequent on the two sites. To confirm that these bands corresponded to identical phylotypes, each band was cloned separately for the two sites. The bands were excised from the second gel and the fragment of the variable V3 region of the eubacterial 16S rRNA gene was amplified with the primers 341f without the GC-clamp and 518r. Afterward the amplified products were cloned into the PCR II plamids using TA cloning

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

Kit (Fisher Scientific SA, France) according to the manufacturer instructions. Four clones per band were chosen for sequencing. The sequencing was done using SP6 promoter primer. The 16S rRNA gene sequences obtained were 167, 189, 193 bp long. The sequences identified as no chimera were compared to the GenBank database using the online software and the Basic Local Alignment Search Tool algorithm (BLAST) (Altschul *et al.*, 1997). The accession numbers of the sequences deposited in Genbank are FN555177 – FN555194 and FN555208 – FN555229.

Physico-chemical analyses

Overlying water was collected immediately after core recovery for further nutrient analyses. Subsequently, one core at each station was sliced into eight horizontal layers up to a total depth of 8 cm (0.5 cm for the top 2 cm, 1 cm up to 4 cm, 2 cm up to 8 cm) within less than 30 min. At the beginning of July each core was sliced up to 8 cm, whereas at the other dates only one core was sliced up to 8 cm the two other cores being only sliced up to 1 cm (0-0.5 cm ; 0.5-1 cm). For every level, a sub-sample was centrifuged in a Whatman VectaSpin 20TM centrifuge tube filter (0.45 µm) under inert atmosphere (N₂) at 3000 rpm and 4 °C for 20 min in order to collect pore waters. The pore water was acidified to pH ~ 2. An aliquot was frozen for further nutrient analysis. A sub-sample of wet sediment was frozen for the subsequent organic C and N analysis. Diffusive fluxes were

calculated using the first Fick's law adapted for sediments (Berner, 1980): $F_d = -\phi \times D_s \times \left(\frac{dC}{dz}\right)$ (1),

where F_d is the rate of efflux ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$), Φ is the sediment porosity (dimensionless) of the upper sediment sample, D_s is the bulk diffusion coefficient ($\text{m}^2 \text{d}^{-1}$) and dC/dz is the concentration gradient at sediment-water interface ($\mu\text{mol m}^{-4}$).

For phosphate and ammonia, dC/dz was calculated from linear regression on the concentration values at bottom water and just below the interface. For sulphide, dC/dz was calculated at the

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

oxic/anoxic interface. D_s was corrected for tortuosity, *i.e.*, $D_s = \frac{D_0}{\theta^2}$, where θ is the tortuosity (dimensionless), D_0 is the diffusion coefficient in water for PO_4^{3-} , NH_4^+ ($\text{m}^2 \text{d}^{-1}$). The diffusion coefficient in water (D_0) is corrected for the in situ bottom water temperatures (Li and Gregory, 1974) and the value of θ is assumed to be equal to $\sqrt{1 - 2 \times \ln \phi}$ (Boudreau, 1996).

Statistical analyses

DGGE bands patterns from sediments samples of each site and each month were compared. Firstly, the DGGE bands profiles were normalised with the rolling disk method, then the relative intensity of detected bands was calculated using the GEL COMPAR II software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). To avoid possible gel effect, analyses were performed on individual gels. For each site, profiles of 2007 were analysed separately from those of 2008 since the samples of the two years were loaded on separated gels. Binary matrix corresponding to the relative intensity and the position of each band in comparison to total bands intensity, and matrix corresponding to the presence/absence and relative position were generated using PRIMER-E LDT software. Similarity matrix was then calculated using the Bray-Curtis coefficient. Afterwards, multi-dimensional scaling (MDS) (Kruskal & Wish, 1978) representing the similarity ranks of community structure between samples were originated from the matrices. The resulting MDS map shows every band pattern as one point and relative changes among different DGGE patterns can be visualized and interpreted as the distances between the points. A smaller distance between points means the more similar DGGE banding patterns.

Oyster culture effect was tested for each site individually by comparing bands patterns of replicates from sediment samples collected beneath tables with those collected 30 m from the tables. We carried out analysis of similarity (ANOSIM) to test differences between oyster station samples and the samples of control station. Temporal variation also was essayed and correlation with environmental parameters was determined.

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

Results:

Sediment physico-chemical parameters

Tables 9 and 10 show some physicochemical parameters of the two sampling stations of both sites Aber-Benoît and Rivière d'Auray. The variability of these parameters at different sampling farms was obvious. Except for NO_3^- and HS^- , the fluxes of NH_4^+ and PO_4^{3-} and the concentration of total organic carbon were higher in Rivière d'Auray than in Aber-Benoît. In June 2007 and June 2008 the NH_4^+ fluxes were higher in oyster station in Aber-Benoît. There are also differences between the benthic fluxes registered in the oyster stations and those recorded in the control stations for both farms.

Table 9: Main biogeochemical characteristics of the sediment of Aber-Benoît. Values of NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} are means of calculated fluxes of three replicates and the values of the HS^- are calculated fluxes of one sediment sample. The values in parentheses are the standard error of the mean. TOC, total organic carbon

Sampling months	TOC ($\mu\text{mol g}^{-1}$)		NH_4^+ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$)		NO_3^- ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$)		PO_4^{3-} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$)		HS^- ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$)	
	Control site	Oyster site	Control site	Oyster site	Control site	Oyster site	Control site	Oyster site	Control site	Oyster site
June 2007	710 (91)	820 (57)	13 (6)	1014(137)	-39 (2)	-30 (2)	0 (0)	34 (6)	0	215
July 2007	475 (12)	764 (134)	8 (2)	134 (21)	-35 (0)	-22 (4)	0.1 (0)	0.7(0.1)	0	38
August 2007	494 (10)	522 (86)	17 (2)	160 (100)	-28 (9)	-25 (7)	1 (0)	2 (1)	1	131
September 2007	520 (62)	623 (119)	35 (13)	165 (3)	-36 (2)	-27 (2)	1.3(0.3)	0.6(0.1)	-1	59
March 2008	972 (402)	1143(481)	33 (7)	68 (6)	-60 (12)	-52 (1)	1 (0)	1 (0)	-1	26
May 2008	1391(993)	2072(765)	39 (16)	171 (79)	-31 (4)	-30 (8)	1 (1)	3 (2)	3	149
June 2008	785 (155)	705 (187)	35 (13)	690 (79)	-43 (8)	-36 (8)	2 (0)	45 (40)	-1	35

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

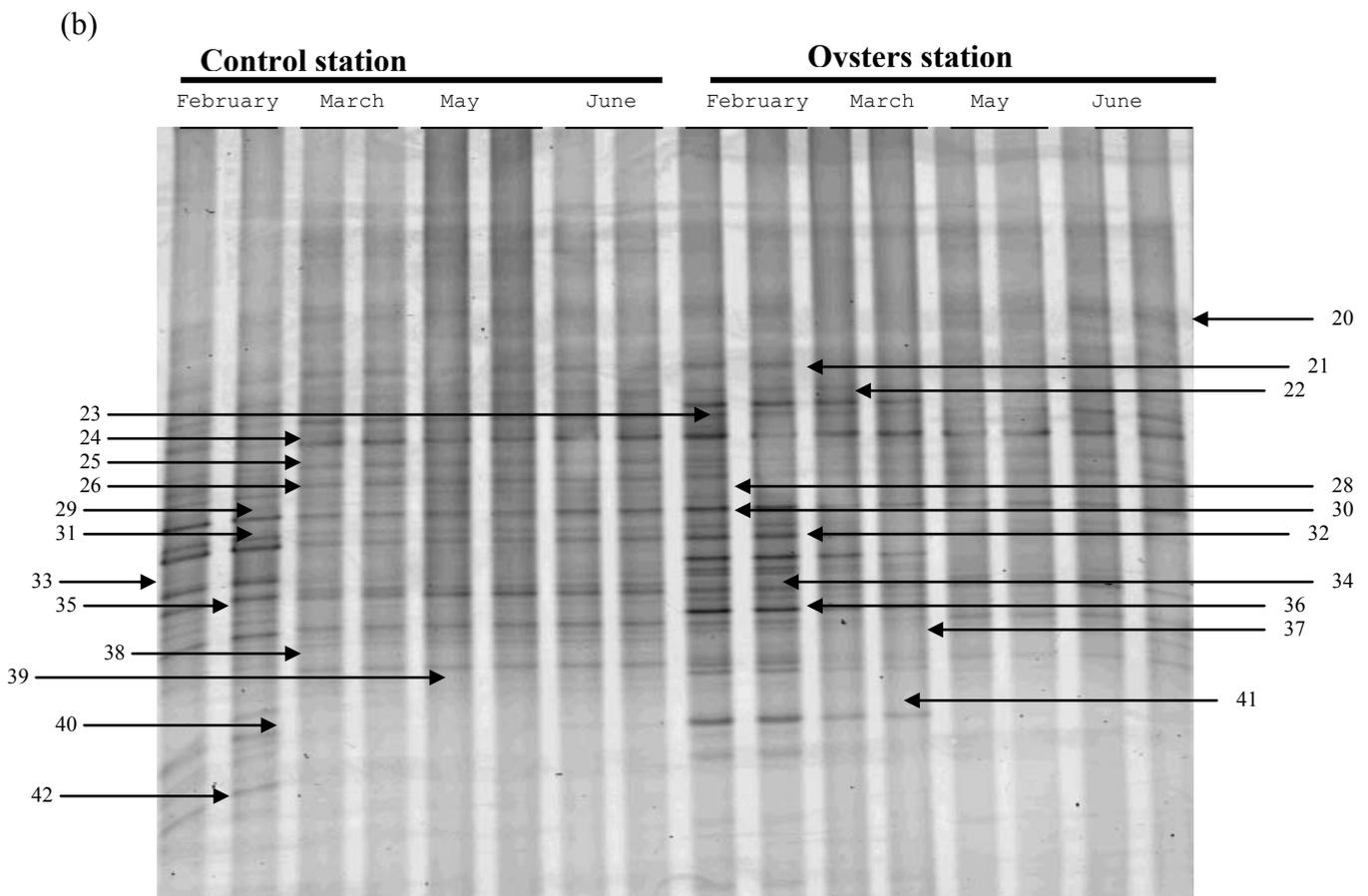
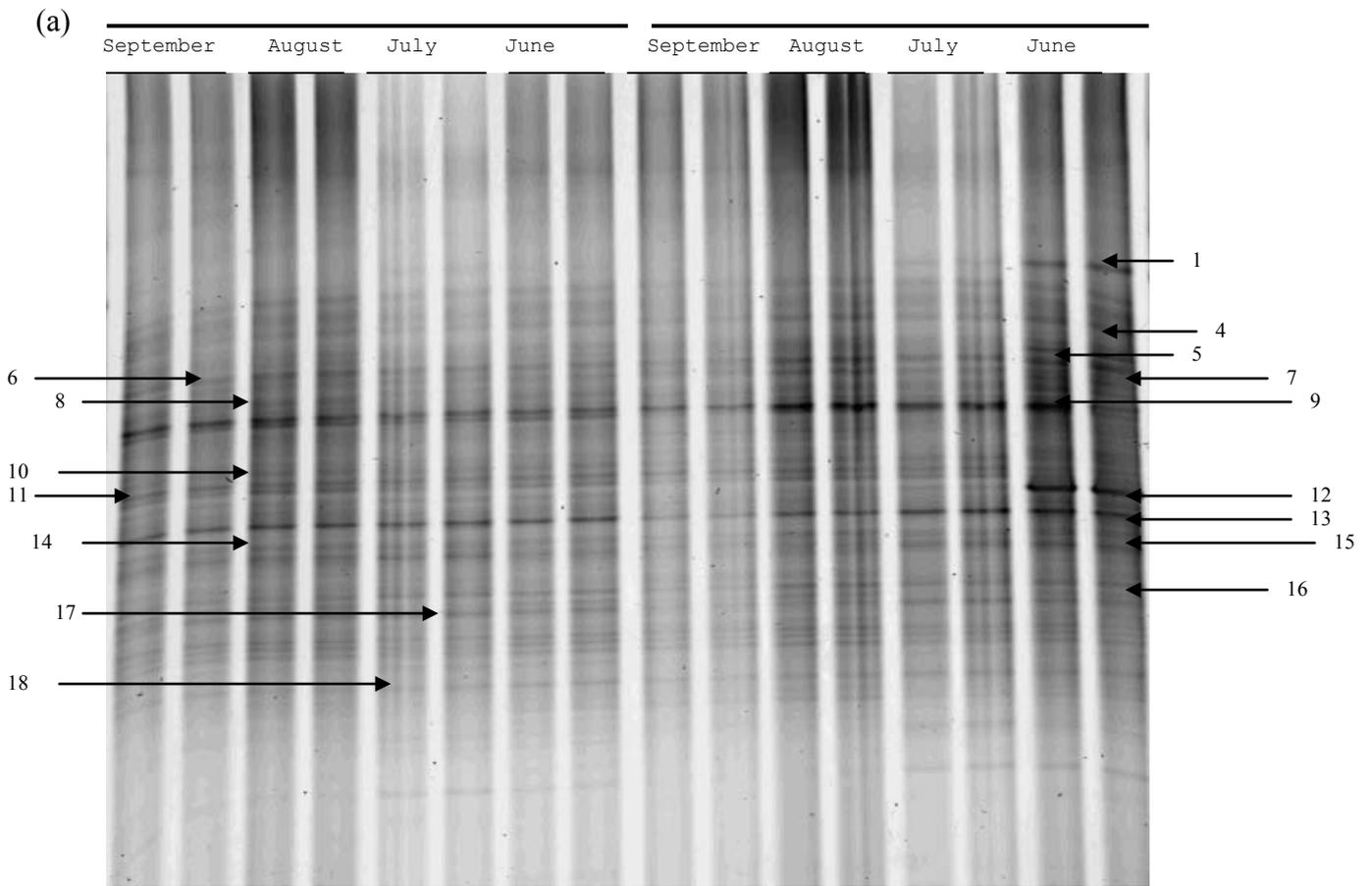
Table 10: Main biogeochemical characteristics of the sediment of Rivière d'Auray. Values of NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} are means of calculated fluxes of three replicates and the values of the HS^- are calculated fluxes of one sediment sample. The values in parentheses are the standard error of the mean. TOC, total organic carbon

Sampling months	TOC($\mu\text{mol g}^{-1}$)		NH_4^+ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$)		NO_3^- ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$)		PO_4^{3-} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$)		HS^- ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$)	
	Control site	Oyster site	Control site	Oyster site	Control site	Oyster site	Control site	Oyster site	Control site	Oyster site
June 2007	973(177)	959(89)	64(8)	152(31)	-2(1)	-1(0)	2(1)	9(2)	0	7
July 2007	1302(244)	1712(138)	90(21)	183(23)	-21(36)	-1(1)	3.7(1.6)	2.6(0.1)	0	1
August 2007	2202(223)	1321(448)	72(38)	173(6)	2(2)	0(0)	2(2)	12(2)	1	23
September 2007	1896(236)	1076(279)	3(2)	178(92)	2(2)	0(0)	1.6(0.6)	19.2(20.4)	65	3
March 2008	1958(443)	1110(485)	63(21)	116(16)	-74(8)	-77(13)	1(1)	1.8(0.2)	1	19
May 2008	2308(400)	2208(433)	206(47)	317(47)	-33(4)	-45(7)	6(4)	17(15)	198	5
June 2008	1460(227)	1593(302)	86(10)	190(31)	-5(8)	-3(5)	2(1)	10(2)	5	8

DGGE profiles and phylogenetic analysis

Amplification and DGGE analysis of the 16S rDNA fragments from Rivière d'Auray and Aber-Benoît showed different banding patterns according to the sampling station (Oyster station or Control station) but also according to the sampling date. Examples of DGGE profiles of bacterial community structures in the sediment of Aber-Benoît (a) and Rivière d'Auray (b) are shown in Fig. 37. For the Aber Benoît site, samples of the period of June to September 2007 are represented while for the Rivière d'Auray, the samples of the period of February to June 2008 are selected to be represented. So, as shown in the figure 2, the DGGE band patterns for each replicates of each sampling station and sampling date were almost similar. In Rivière d'Auray, the replicates of the oyster station in February were identical and were different from the replicates of the control station of the same date (Fig.37b). The DGGE profiles in Aber Benoît displayed the same trends, meaning the replicates of the same sampling station and date were similar and were different from the replicates of the other sampling station of the same date (Fig.37a).

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments



Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

Figure 37: DGGE profiles of sediments samples in Aber-Benoît in 2007 (a) and in Rivière d'Auray in 2008 (b). The sequenced bands are numbered

In Aber Benoît, when all the samples were compared, 28 different bands could be distinguished. However, taking into account profiles of individual sampling station, the number of total detected bands varied between 19 and 28 for the oyster station with the lowest number corresponded to samples from February and the highest to September. For control station, the total detected bands number ranged between 23 and 28. The lowest band number was recorded in June 2008 while the highest were recorded in September 2007.

In Rivière d'Auray, this number was ranged between 15 and 24 for oyster station and 20-28 for control station. At this site, the lowest band numbers for the two sampling station were recorded in September while the highest were recorded in February and March for oyster station and February and June 2008 for control station.

However, no band was station-specific. Indeed, in Aber Benoît for example, each band was detected at least one time either in oyster station or control station. The same resemblance of bands between both stations occurred in Rivière d'Auray, except in February 2008 where 3 bands (27, 30, 34) were specific to oyster station and 2 (40, 42) to control station.

On both sites, 4 bands namely band n° 1, 4, 9, and 15 in the Aber Benoît sediment and 20, 21, 25 and 33 in the Rivière d'Auray sediment were frequently presented throughout the survey on oyster and control stations, although with different intensities. The band n°12 in Aber Benoît and the band n°31 in Rivière d'Auray were interesting since they migrated at the same position on the gel as the band of *V. aestuarianus*. This band was presented in all profiles but its intensity was higher in the sediment of oyster station in June in Aber-Benoît. There were also closely migrated bands, but only dominant bands neatly separated and numbered in the figure 37 were sequenced.

Eighteen bands in Rivière d'Auray and 17 in Aber Benoît were successfully sequenced. Except a few bands which contained different phylotypes, each band corresponded to an unique phylotype. The

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

results of the sequences analysis were shown in tables 11 and 12. Sequence data revealed the presence of seven major phylogenetic groups including *Acidobacter*, *Bacilli*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, α -, δ -, γ -*Proteobacteria* and one unclassified environmental strain.

Table 11: Sequence analysis of bands excised from DGGE gels of Aber-Benoît sediment

Band n°	Phylum and accession number	Accession number	Most related species in Genbank	Genbank Homology
1	<i>Deltaproteobacteria</i> (<i>Desulfobacteriaceae</i>)	FN555177	Sulfate-reducing bacterium JHA1	96%
4a	<i>Gammaproteobacteria</i>	FN555178	Uncultured bacterium	96%
5	<i>Acidobacteria</i>	FN555179	Unculture bacterium clone C08P3MbH	94%
6	<i>Gammaproteobacteria</i>	FN555180	Uncultured bacterium clone AV19F59b	98%
7	<i>Flavobacetrria</i>	FN555181	Winogradskyella sp. K7-7	98%
8	<i>Flavobacteria</i>	FN555182	Unculture bacterium clone Mn3b-B11	98%
9	<i>Gammaproteobacteria</i>	FN555183	Uncultured bacterium clone AN05aug-063	98%
10	<i>Gammaproteobacteria</i>	FN555184	Unculture bacterium clone NY06dec-099	97%
11-a	<i>Verrucomicrobia</i>	FN555185	Uncultured verrucomicrobium bacterium clone LD1-PB2	95%
11-cd	<i>Deltaproteobacteria</i> (<i>Desulfobulbaceae</i>)	FN555186	Uncultured bacterium clone S57	98%
12-acd	<i>Gammaproteobacteria</i> (<i>Vibrionaceae</i>)	FN555188	<i>Vibrio aestuarianus</i> 01/064	
12-b	<i>Gammaproteobacetrria</i>	FN555187	Uncultured gammaproteobacterium clone B05_RAMPDAY15	97%
13	Unclassified environmental bacteria	FN555189	Uncultured bacterium clone sediment_surface48	97%
14-d	<i>Gammaproteobacteria</i>	FN555190	Uncultured bacterium Ld1-1	98%
15	<i>Deltaproteobacteria</i>	FN555191	Uncultured deltaproteobacterium clone YS-UMF5_122	98%
16	<i>Alphaproteobacteria</i>	FN555192	Uncultured alphaproteobacterium clone CL33-G06	98%
17	<i>Alphaproteobacteria</i> (<i>Rhodospirillaceae</i>)	FN555193	Uncultured bacterium clone C15cm.A08	97%
18	<i>Verrucomicrobia</i>	FN555194	Uncultured bacterium clone L2-B01	98%

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

Table 12: Sequence analysis of bands excised from DGGE gels of Rivière d'Auray sediment

Band n°	Taxonomic group	Accession number	Most related species in Genbank	Genbank Homology
22	<i>Gammaproteobacteria</i> (<i>Vibrionaceae</i>)	FN555208	<i>Vibrio anguillarum</i> <i>Vibrio ordalii</i>	98% 98%
23	<i>Gammaproteobacteria</i>	FN555209	Uncultured bacterium isolate JH12_C45	98%
24	<i>Gammaproteobacteria</i>	FN555210	Uncultured bacterium clone NY04sep-017	97%
27	<i>Gammaproteobacteria</i>	FN555211	Uncultured bacterium clone OS02- TRNA-74 16S	98%
28	<i>Deltaproteobacteria</i>	FN555212	Uncultured bacterium clone AN05aug-096	97%
29-ab	<i>Gammaproteobacteria</i> (<i>Vibrionaceae</i>)	FN555213	<i>Vibrio aestuarianus</i> strain 01/031	99%
29-d	<i>Alphaproteobacteria</i>	FN555214	Uncultured Rhodobacteraceae bacterium clone Q8-C10	98%
30	<i>Gammaproteobacteria</i>	FN555215	Uncultured gammaproteobacterium clone SIMO-4102	96%
31	<i>Bacteroidetes</i>	FN555216	Unculture Bacteroidetes bacterium clone CL18-D02	92%
33	<i>Gammaproteobacteria</i>	FN555217	<i>Microbulbifer thermotolerans</i>	97%
34	<i>Bacilli</i> (<i>Bacillaceae</i>)	FN555218	<i>Bacillus</i> sp. GN-M06-10	97%
35	<i>Deltaproteobacteria</i>	FN555219	Unculture Deltaproteobacterium clone YS-UMF5_80	98%
36-a	<i>Bacilli</i> (<i>Paenibacillaceae</i>)	FN555220	<i>Brevibacillus laterosporus</i> strain 42S9	96%
36-d	Unclassified environnemental bacteria	FN555221	Uncultured bacterium clone MBHOS-04	95%
37	<i>Gammaproteobacteria</i>	FN555222	<i>Microbulbifer thermotolerans</i>	95%
38-a	<i>Gammaproteobacteria</i>	FN555223	<i>Marinobacter taiwanensis</i> strain GI-1701	98%
39	<i>Bacilli</i>	FN555224	Unculture Firmicutes bacterium clone MFC-10	98%
40	<i>Listeriaceae</i>	FN555225	Uncultured synthetic wastewater bacterium tmbr15-16	94%
41-ab	<i>Acidobacteria</i>	FN555226	Uncultured <i>Acidobacteriaceae</i> bacterium clone NdGal159	96%
41-c	Uncultured bacterium	FN555227	Uncultured bacterium clone G2-01	93%

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

41-d	<i>Gammaproteobacteria</i>	FN555228	<i>Marinobacter sp. Trimyema-1</i>	98%
42	<i>Bacilli</i>	FN555229	Bacterium enrichment culture clone 080213-ABM-Febex	96%

MDS analyses of the data

At first, the replicates from the same sampling station were compared to check if they were similar. In 2007, three replicates were sampled per date on each station. For statistical purpose, four replicates were sampled in 2008. The data analysis was performed taking into account the Bray-Curtis similarity values of the DGGE bands profiles using the presence/absence and the relative intensity of each band. These parameters were used to generate MDS map for each gel (Figs 38 and 39). The results showed that replicates from the same sampling station collected at the same date were clustered together. This result confirms the visual inspection of the DGGE profiles (Fig.37). However, there were some extreme points in July, August and September 2007 in Aber Benoît and Rivière d'Auray. These points corresponded to profiles differences in the same replicate. The statistical analysis using the Bray-curtis similarity showed significant effect of presence of oyster in June 2007 ($R = 0.815$; 10%), August ($R = 0.593$; 10 %), September ($R = 1$; 10 %), February ($R = 1$; 10 %) and March ($R = 1$; 10 %) in Rivière d'Auray. Seasonal variations were significant between June and July but not for August and September in 2007. In 2008 February and March profiles were similar and were significantly different from those of May and June. In Aber Benoît, the effect of the presence of oysters was significant only in June 2007 ($R = 0.926$; 10 %) and in February 2008 ($R = 0.656$; 2.9 %). The analysis also revealed seasonal variation between June and July 2007 ($R = 0.926$ for Control station and $R = 1$ for Oyster station) and between August and September 2007 ($R = 0.704$ for control station and $R = 0.370$ for oyster station). In 2008, the profiles of February were different from those of March, May and June, which were almost similar. Using spearman correlation rank analysis with the benthic fluxes temperature, showed significant relation with the bacterial profiles in Aber-Benoît in June and July ($Rho: 0,325$; 1,8 %), in August-September ($Rho: 0,413$; 0,3 %) and

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

with the 2008 bacterial profiles (Rho: 0,139; 6 %). In Rivière d'Auray it was significantly related to the profiles in June – July in Rivière d'Auray (Rho: 0,398; 0,1 %). In Aber Benoît, nitrate fluxes also was significantly related to the DGGE profiles in June – July (Rho: 0,198; 8,3). It was also in Rivière d'Auray, in June – July (Rho: 0,412; 3,2) and in August – September (Rho: 0,307; 6,6 %). Phosphate fluxes also have significant correlation with DGGE profiles in August – September (Rho: 2,13; 4,6%).

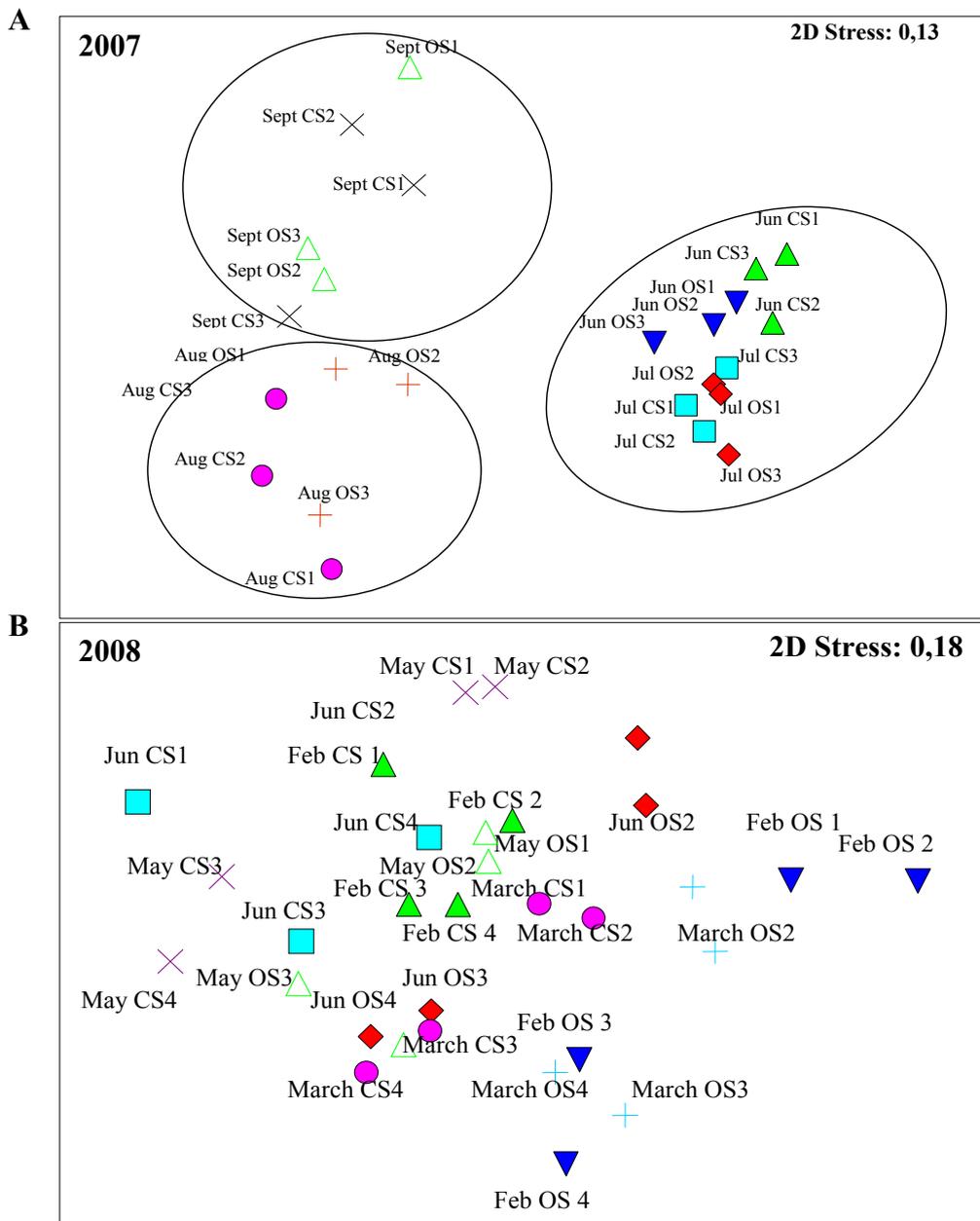


Figure 38 : MDS map from DGGE bands profiles of (A) all 24 samples of 2007 and (B) all 32 samples of 2008, showing spatial and temporal variations of bacterial diversity in the sediment of Aber-Benoît

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

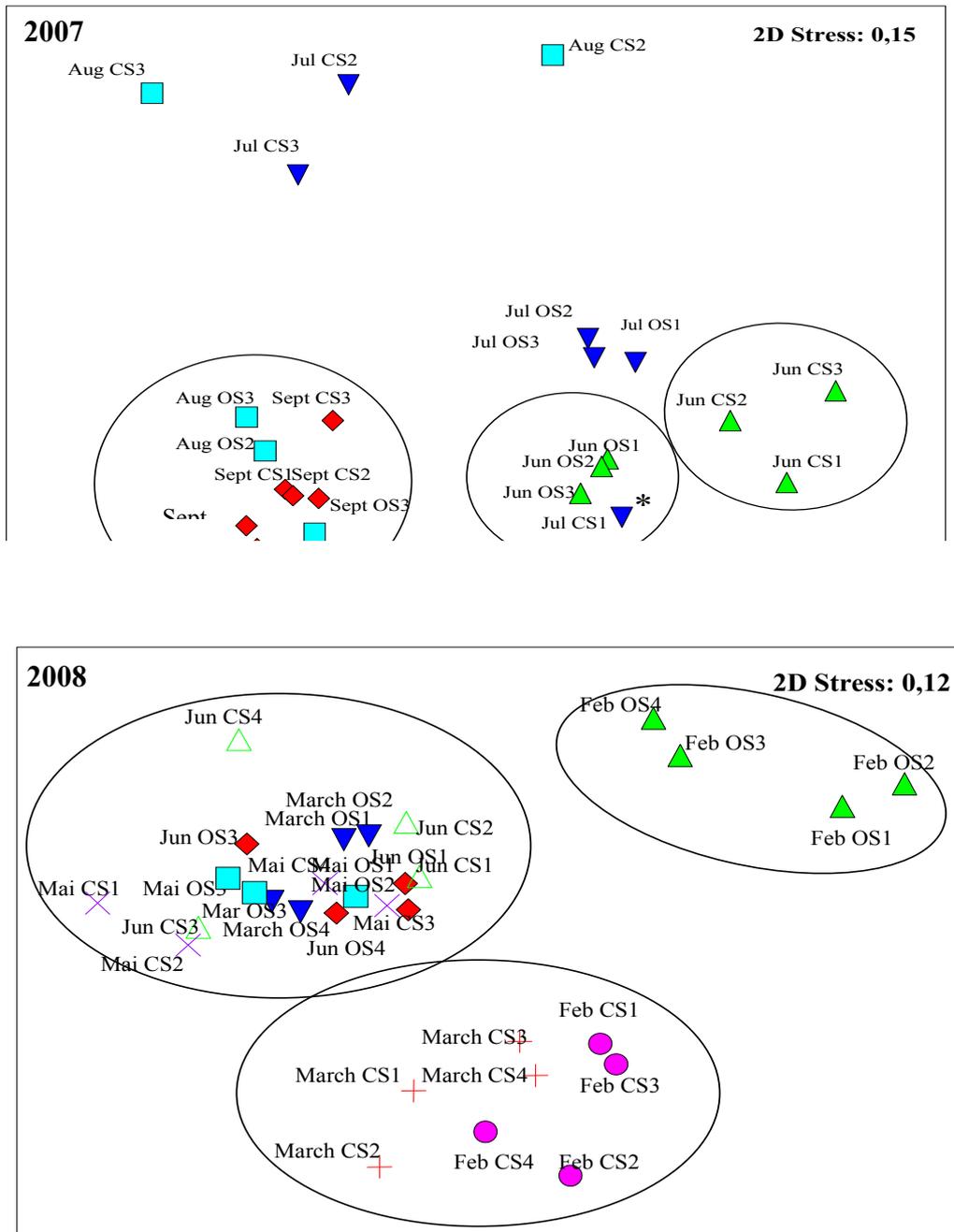


Figure 2008

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

Discussion

Bacterial communities are known to play role in the decomposition of organic matter and nutrient transformation in marine and freshwater sediments. The aim of the study was to investigate the impact of the presence of oyster tables on the biogeochemical parameters and bacterial community structure and to examine what factor has the largest influence on bacterial community structure.

Organic enrichment of sediment may take place much more in the oyster station sediment than in the control. As evidenced by the benthic fluxes, high mineralisation processes occurred in oyster station at both sites. However the total organic carbon in sediment was almost equivalent in both stations of both sites. Only the rapid decomposition of organic matter may explain the absence of enrichment of sediment. In previous studies oysters farm impact resulted in the accumulation of organic matter in sediment underneath the oyster tables (Mazouni *et al.*, 1996). This was the consequence of the sedimentation of particulate matters, which corresponds to the faeces and pseudofaeces of oysters.

In Rivière d'Auray no significant differences were noticed for the ammonia and sulphide fluxes between both stations. Stranded, macrophyte (*Laminaria Fucus*) was frequently observed in decomposition in the control station and they may provide equivalent or more organic matter than oyster biodeposits. In addition, water courant may disperse biodeposits and then avoiding their accumulation on the bottom.

We used the multidimensional scaling method for analysing DGGE profiles. The advantages of this method is that it takes into account the presence or absence of bands as their intensities and permit to consider the effect of environmental variables on DGGE profiles (Salles *et al.*, 2004). Also, it is possible to illustrate how the bacterial communities are clustered according to different factors. MDS graphs showed that DGGE profiles of oyster stations or control stations grouped together according to sampling date in both farms. Since bacteria are known to respond promptly to organic matter, we concluded here that sediments that have similar characteristics have also similar bacterial

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

community composition. Several studies reported quantitative impact of organic matter loading by anthropogenic activities on the bacterial abundance (Danovaro *et al.*, 1999; Koop & Griffiths, 1982). However, qualitative aspects such as the structure of microbial communities in organic rich sediments are scarcely studied (Cottrell & Kirchman, 2000; Vezzulli *et al.*, 2002). In our study, statistical analyses showed frequent significant effect of presence of oyster biodeposits on the sediment bacterial structure in Rivière d'Auray while in Aber Benoît the effect was punctual. In Aber Benoît, the organic matter which sedimented may be quickly mineralised in such a way that it not have time to induce change in bacterial composition.

In the Pearson rang correlation analysis, temperature was significant environmental factor. Sediment parameters like the fluxes of nitrate and phosphorus in Rivière d'Auray and nitrate in Aber-Benoît also had significant influence. Since mineralization process was influenced by temperature, it is more likely that the bacterial structure variation was mainly due to temperature. The effect of temperature on the bacterial community distribution in sediment has already been reported by several authors elsewhere. However it was reported that total phosphorus and organic matter could be another factors influencing the bacterial community composition in the sediment (Zeng *et al.*, 2009).

Between 20 to 30 bands were detected in both sites. These numbers were similar to those found in intertidal sediments elsewhere using the same primers (Plante & Wilde, 2004). However, resolution of the DGGE profiles in terms of bands number is not always sufficient to illustrate the considerable bacterial diversity in sediment communities. Some studies showed that fragments of different sequences might migrate at the same position (Ranjard *et al.*, 2000; Vallaeys *et al.*, 1997). The length of fragment, the time of migration and the gradient used here seemed convenient for the maximum resolution. The bacterial groups identified by sequence analysis are commonly found in freshwater and marine environments. Approximately 44 % of the bands sequenced in Rivière d'Auray and 42 % in Aber-Benoît were affiliated to *γ-proteobacteria*. The second predominant group belonged to *δ-proteobacteria* in Aber Benoît and *Bacilli* in Rivière d'Auray. The *γ-proteobacteria* and *δ-*

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

proteobacteria are ubiquitous and widely occur in marine sediments (Bissett *et al.*, 2006; Bowman *et al.*, 2003; Bowman & McCuaig, 2003; Gray & Herwig, 1996; Urakawa *et al.*, 1999). Their presence does not depend on the degree of organic matter pollution. It is not surprising if this group was importantly represented among our DGGE bands in both sites.

Members of *Bacilli* class were currently encountered in aquatic environment and have also been isolated from molluscans. The presence of the groups of *Bacteroidetes*, *Acidobacteria* and *Listeriaceae* can also be attributed to anthropogenic activities such as agriculture and the presence of catchment areas. Many *Verrucomicrobia* are known to be prosthecate allow them to be resistant to grazing and taking advantage in nutrients uptaking. They were ubiquitous of various environments including agricultural fields (Ueda *et al.*, 1995), forest soil (Liesack & Stackebrandt, 1992), freshwater and pelagic (Fuhrman *et al.*, 1993) environments. Many phylotypes did not group with cultured bacteria, but grouped with other environmental clones from a wide array of marine benthic environments.

Finally, the sediments of the two farms possessed different environmental conditions which fluctuated over time, and high bacterial diversity. Although the phylogenetic groups detected were almost similar between the two farms, the phylotypes inside each group were different. Furthermore, one phylogenetic groups meaning the *Bacilli* (Rivière d'Auray) and *Verrucomicrobia* (Aber-Benoît) differentiated the two farms. It seems that each sediment possessed its own bacterial community. The bacterial communities had seasonal variation which is in consistence with the environmental parameters fluctuation. In addition, the impact of oyster biodeposit on the biogeochemical processes was evident whereas the DGGE profiles showed their impact on bacterial population was not conclusive. Consequently, as suggested by (Bissett *et al.*, 2006), we can say that the two sediments possessed a large range of functional redundancy which contributed to their ability to maintain divers communities despite the perturbation caused by increased organic load.

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

Acknowledgements

This work was financially supported by the Brittany Region and the French Research Institute for Exploitation of the sea (IFREMER). The authors would like to thank Marie-José Garet-Delmas for her technical assistance.

References

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J. H., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389-3402.

Bissett, A., Bowman, J. & Burke, C. (2006). Bacterial diversity in organically-enriched fish farm sediments. *FEMS Microbiol Ecol* **55**, 48-56.

Bowman, J. P., McCammon, S. A., Gibson, J. A. E., Robertson, L. & Nichols, P. D. (2003). Prokaryotic metabolic activity and community structure in Antarctic continental shelf sediments. *Appl Environ Microbiol* **69**, 2448-2462.

Bowman, J. P. & McCuaig, R. D. (2003). Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Appl Environ Microbiol* **69**, 2463-2483.

Cottrell, M. T. & Kirchman, D. L. (2000). Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the Cytophaga-Flavobacter cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Appl Environ Microbiol* **66**, 1692-1697.

Danovaro, R., Marrale, D., Della Croce, N., Parodi, P. & Fabiano, M. (1999). Biochemical composition of sedimentary organic matter and bacterial distribution in the Aegean Sea: trophic state and pelagic-benthic coupling. *Journal of Sea Research* **42**, 117-129.

Deslous-Paoli, J. M., Souchu, P., Mazouni, N., Juge, C. & Dagault, F. (1996). Relationship between environment and resources: impact of shellfish farming on a Mediterranean lagoon (Thau, France). In *Annual Meeting of the National-Coastal-Oceanography-Programme - National Research Project on Coastal Zones*, pp. 831-843. Nantes, France.

Fuhrman, J. A., McCallum, K. & Davis, A. A. (1993). Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific oceans *Appl Environ Microbiol* **59**, 1294-1302.

Gray, J. P. & Herwig, R. P. (1996). Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Appl Environ Microbiol* **62**, 4049-4059.

Kemp, P. F. (1990). The fate of benthic bacterial production. *Reviews in Aquatic Sciences* **2**, 109-124.

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

- Koop, K. & Griffiths, C. L. (1982).** The relative significance of bacteria, meiofauna and macrofauna on an exposed sandy beach *Marine Biology* **66**, 295-300.
- Kruskal, J. & Wish, M. (1978).** *Multidimensional Scaling*. Beverley Hills, CA: Sage Publications.
- Liesack, W. & Stackebrandt, E. (1992).** Occurrence of novel groups of the domain bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment *Journal of Bacteriology* **174**, 5072-5078.
- Mazouni, N., Gaertner, J. C., DeslousPaoli, J. M., Landrein, S. & dOedenberg, M. G. (1996).** Nutrient and oxygen exchanges at the water-sediment interface in a shellfish farming lagoon (Thau, France). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **205**, 91-113.
- Murray, A. E., Hollibaugh, J. T. & Orrego, C. (1996).** Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2676-2680.
- Muyzer, G., Dewaal, E. C. & Uitterlinden, A. G. (1993).** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes-coding for 16S ribosomal-RNA. *Appl Environ Microbiol* **59**, 695-700.
- Plante, C. J. & Wilde, S. B. (2004).** Biotic disturbance, recolonization, and early succession of bacterial assemblages in intertidal sediments. *Microb Ecol* **48**, 154-166.
- Ranjard, L., Poly, F. & Nazaret, S. (2000).** Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology* **151**, 167-177.
- Samain, J. F. & McCombie, H. (2008).** Summer mortality of pacific oyster *Crassostrea gigas* The Morest project, pp. 379. Edited by Quae.
- Susumu, I. & Takeo, I. (1955).** Ecology of oyster bed: I. On the decline of productivity due to repeated cultures. *Tohoku Journal of Agricultural Research* **4**, 15.
- Syvyk, A., Nalian, A., Hume, M. & Martynova-VanKley, A. (2008).** A positive control for detecting heteroduplexes in DGGE for microbial community fingerprinting. *Texas Journal of Science* **60**, 33-44.
- Ueda, T., Suga, Y. & Matsuguchi, T. (1995).** Molecular phylogenetic analysis of a soil microbial community in a soybean field *European Journal of Soil Science* **46**, 415-421.
- Urakawa, H., Kita-Tsukamoto, K. & Ohwada, K. (1999).** Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology-Sgm* **145**, 3305-3315.
- Vallaey, T., Topp, E., Muyzer, G., Macheret, V., Laguerre, G., Rigaud, A. & Soulas, G. (1997).** Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiol Ecol* **24**, 279-285.

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

Vezzulli, L., Chelossi, E., Riccardi, G. & Fabiano, M. (2002). Bacterial community structure and activity in fish farm sediments of the Ligurian sea (Western Mediterranean). *Aquaculture International* **10**, 123-141.

Zeng, J., Yang, L. Y., Du, H. W., Xiao, L., Jiang, L. J., Wu, J. & Wang, X. L. (2009). Bacterioplankton community structure in a eutrophic lake in relation to water chemistry. *World J Microbiol Biotechnol* **25**, 763-772.

Zhou, J. Z., Bruns, M. A. & Tiedje, J. M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* **62**, 316-322.

Le chapitre 3 de ce document concernera l'étude de l'écologie de ce *Vibrio* dans le sédiment en rapport avec les huîtres dans le but de déterminer si le sédiment constitue un réservoir.

Chapitre 2 : Etude de la structure des communautés bactériennes des sédiments

**Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir
de pathogènes de l'huître creuse
Crassostrea gigas : étude de
l'écologie de *Vibrio aestuarianus*
(Articles 2 et 3)**

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

Introduction

Parmi les facteurs de risque mis en évidence lors des analyses de Morest, les agents infectieux identifiés sont de nature virale ou bactérienne. Le virus OsHV-1 de type herpes a été régulièrement isolé de naissains d'huîtres malades (Renault *et al.*, 1994; Renault *et al.*, 1995). Des espèces bactériennes ont été associées à la microflore d'huîtres lors d'évènements de mortalités. Les analyses ont montré que 56% des huîtres contiennent des bactéries appartenant à l'espèce *V. aestuarianus*. Dans d'autres cas, les espèces du groupe polyphylétique de *V. splendidus*. Ainsi, parmi les bactéries, les *Vibrio* constituent le genre bactérien le plus couramment rencontrés dans les épisodes de mortalités.

Cependant, il existe très peu d'études concernant leur écologie. Comme nous l'avons signalé dans la partie bibliographique, des études ont été menées concernant les *Vibrio* pathogènes de l'humain ou de poissons. En se basant sur les différents résultats, il en sort que les membres de ce genre sont endogènes aux estuaires et au milieu marin en général. Ils peuvent se rencontrer dans l'eau de mer, sur les crustacées, les mollusques mais aussi dans le sédiment.

En se basant sur l'étude de l'écologie de *V. aestuarianus*, le pathogène le plus couramment isolés lors des crises de mortalités avant 2008 (figure 40), nous nous proposons de déterminer le risque potentiel du sédiment en tant que réservoir de pathogènes d'huîtres.

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

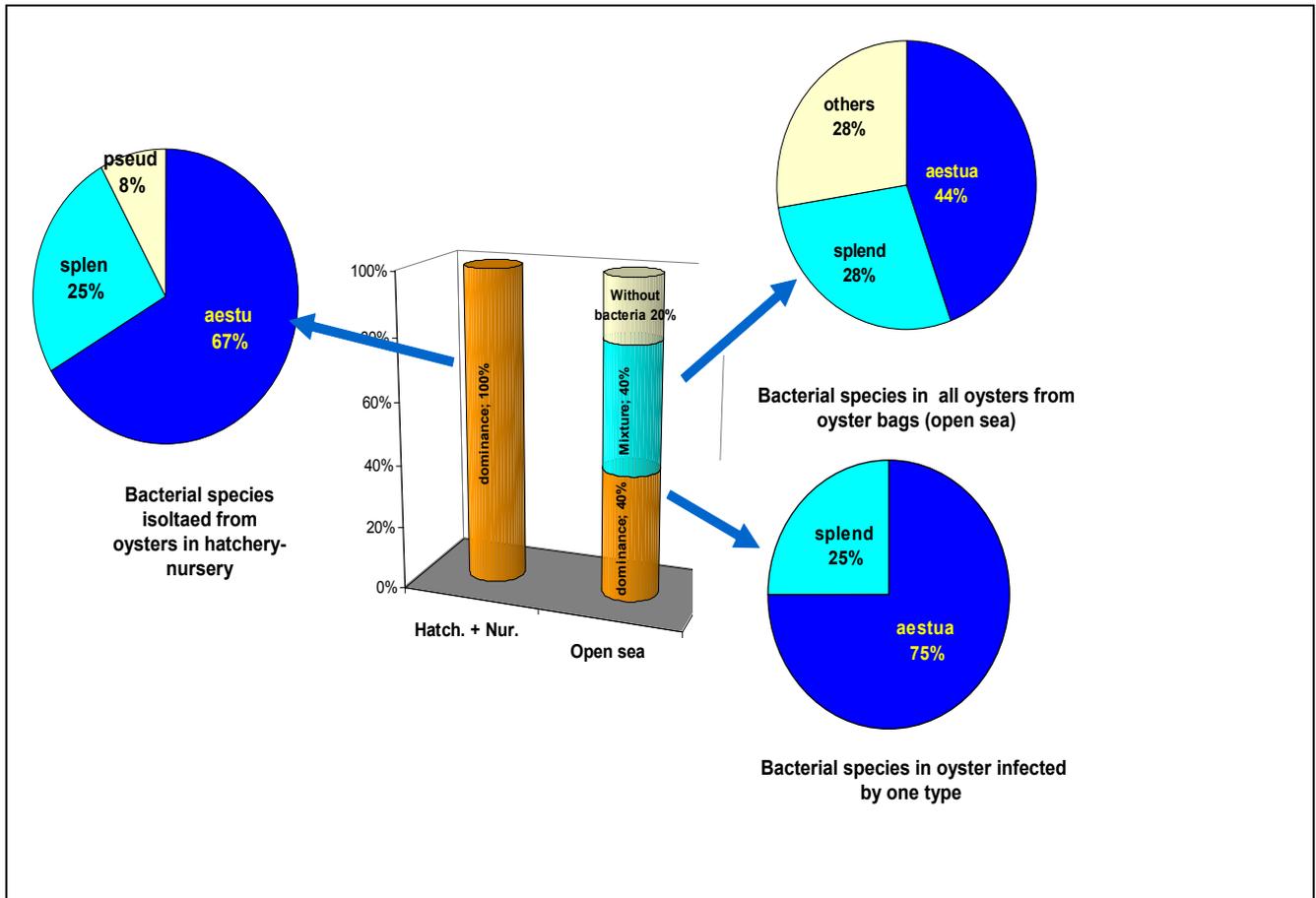


Figure 40 : Fréquence des espèces bactériennes isolées dans les huîtres moribondes dans les parcs ou les nurseries lors d'évènements de mortalités estivales (Samain & McCombie, 2008)

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

I. Article 2 : Ecologie de *Vibrio aestuarianus* pathogène de l'huître creuse *Crassostrea gigas*

Les résultats de cette partie sont présentés dans un article soumis dans « Disease of Aquatic Organisms » et dont un résumé en Français est présenté ci-dessous.

Résumé

Cette étude de l'écologie de *V. aestuarianus* dans l'environnement se donnait pour objectif d'observer le comportement de *V. aestuarianus* dans les parcs ostréicoles : où réside-t-il, comment circule-t-il et fluctue-t-il au cours des saisons? En nous référant aux données bibliographiques et aux résultats préliminaires concernant la détection cette bactérie dans le sédiment, nous avons considéré le sédiment comme source potentielle de *V. aestuarianus*. Ainsi, l'objectif de départ était de détecter et de quantifier *V. aestuarianus* dans le sédiment et dans les huîtres afin de suivre ses variations au cours des différentes saisons, de déterminer les facteurs de l'environnement qui régissent sa prévalence. Nous n'avons pas retenu la colonne d'eau ni le plancton car les masses d'eau étant particulièrement renouvelées dans les zones d'études, leur échantillonnage présentait de grandes difficultés méthodologiques pour qu'il soit représentatif.

Les échantillonnages ont été réalisés sur deux années, de juin à septembre 2007 et de février, mars, mai et juin 2008, sur deux sites ostréicoles, l'un situé en aber Benoît et l'autre en de la rivière d'Auray (Cf. Chapitre 1.I) Au cours de ces suivis, la concentration des bactéries totales, des *Vibrio* et celles de *V. aestuarianus* ont été déterminées dans le sédiment et l'hémolymphe des huîtres. De même, la température, la salinité et le pH de l'eau de chaque ont été mesurés.

Les méthodes d'étude ont été décrites précédemment (Cf. Données bibliographiques : IV-1-1 Le dénombrement).

Les résultats ont montré une variabilité saisonnière dans l'abondance des bactéries totales, des populations de *Vibrio* et de *V. aestuarianus* dans le sédiment et dans les huîtres. La température de l'eau influence fortement l'abondance des *Vibrio* et de *V. aestuarianus* dans les deux types de milieux. Les concentrations de *V. aestuarianus* dans le sédiment ainsi que dans l'hémolymphe des huîtres sont particulièrement élevées pendant la période estivale. En hiver, cette bactérie n'a été détectée dans aucun des deux compartiments. La méthode utilisée étant basée sur une mise en culture préalable des bactéries du sédiment, nous avons suggéré l'entrée en état VBNC des cellules de cette

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

bactérie pendant la période hivernale. Ainsi, cette bactérie pourrait persister en de faible quantité dans le sédiment pendant la période hivernale sous forme de résistance c'est-à-dire de VBNC. L'augmentation de sa concentration pendant la période favorable ainsi que la remise en suspension du sédiment favorise son passage vers l'eau de mer et sa filtration par les huîtres. Sa concentration et sa persistance dans les organes des huîtres vont dépendre du système immunitaire de ces dernières. Ainsi *V. aestuarianus* était absent dans l'hémolymphe des huîtres durant l'été 2008 alors qu'elle était présente dans le sédiment. Les huîtres qui contiennent *V. aestuarianus* peuvent aussi enrichir le sédiment situé en dessous. Elles fournissent également des biodépôts qui sont le support de la croissance bactérienne.

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

Occurrence and seasonality of *Vibrio aestuarianus* in sediment and *Crassostrea gigas* haemolymph at two oyster farms in France (Accepted in Diseases of Aquatic Organisms)

Afi Azandégbé ¹, Matthieu Garnier ¹, Françoise Andrieux-Loyer ², Roger Kérouel ²Xavier Philippon ², Jean-Louis Nicolas ¹

1 IFREMER, Laboratoire de physiologie des Invertébrés, PFOM, Centre de Brest
BP70. 29280 Plouzané, France

2 IFREMER Laboratoire Dyneco Centre de Brest BP70. 29280 Plouzané, France

Keywords: *Vibrio aestuarianus*; *Crassostrea gigas*; sediment; seasonal abundance; colony-blot

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

Abstract

Vibrio aestuarianus is frequently found in coastal areas and can infect and induce mortalities in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. However, nothing is known about its distribution and seasonality in the estuarine environment, especially where oyster farming is practiced. Its occurrence was investigated in sediment and oyster haemolymph at two oyster farms in Brittany (France) over 2 years during two periods from June to September 2007 and from February to June 2008. Total heterotrophic bacteria were cultured on marine agar while total *Vibrio* spp and *V. aestuarianus* were selectively numerated using TCBS agar and species-specific hybridisation methods, respectively. PCR was performed to detect *V. aestuarianus* in sediment when it became unculturable. As in total *Vibrio* spp, *V. aestuarianus* had a seasonal trend. The highest concentrations were recovered in the warmest months. Its abundance ranged from 10^2 to 4×10^5 CFU mL⁻¹ in haemolymph and from 10^3 to 1×10^4 CFU g⁻¹ in the sediment. Temperature was the main factor influencing the concentration of *Vibrio* spp and *V. aestuarianus* in the sediment. Then *V. aestuarianus* might subsist during the cold seasons in the sediment, from which it can emerge when environmental conditions became favourable.

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

Introduction

Pacific oysters have suffered irregularly from summer mortalities for the last ten years or more in France. This has concerned mainly juveniles from 3 to 18 months of age. A multidisciplinary study was conducted to identify causes of these mortalities (Samain & McCombie, 2008). The disease is characterised by a complex syndrome that depends on several factors including the physiological status of the oysters, pathogens such as the herpes virus and some *Vibrio* species, and environmental factors such as temperature, phytoplankton abundance, and sediment. Experiments demonstrated that the proximity of oysters to the sediment increased mortalities. This impact of sediment may be caused by the release of toxic substances and/or the presence of pathogens. High concentrations of the herpes virus in oyster tissues explained about 50% of the mortalities until summer 2008, when its prevalence reached around 90 % in moribund oysters. Septicaemic *Vibrio* spp including *V. splendidus* and *V. aestuarianus* have also been frequently isolated in moribund oysters in the field during summer mortalities, as well as in hatcheries and nurseries. The prevalence of *V. aestuarianus* reached about 56 % (Garnier *et al.*, 2007) until the mortality events of 2008 and 2009. It can be considered as a pathogen since the experimental infection was reproduced by injection, as well as by bathing (Garnier *et al.*, 2008). Recently, taking into account its virulence and other phenotypic traits specifically found in French isolates, two subspecies were created: *V. aestuarianus* *subsp. aestuarianus* and *V. aestuarianus* *subsp. francensis*. (Garnier *et al.*, 2008).

Investigations on the mechanism of *V. aestuarianus* infection led to the identification of a protease named *V*_{am}, which is a zinc-dependent metalloprotease. This protease is implicated in the virulence of this bacterium since it notably reduces haemocyte efficiency in oysters (Labreuche *et al.*, 2006). Therefore, more attention has been paid to its role as a significant *C. gigas* pathogenic agent. However, few studies have been undertaken concerning the environmental behaviour of either *V. aestuarianus* or any other *Vibrio* species pathogenic for marine invertebrates.

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

Ecological studies would be very useful to identify the environmental sources of these *Vibrio* spp and to understand how they infect their host, so that appropriate measures can be taken to prevent or limit the infection. The ecology of some human pathogenic *Vibrio* species (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*) has been extensively studied (Eiler & Bertilsson, 2006; Eiler *et al.*, 2007), mainly in seawater and some reports (Fukushima & Seki, 2004; Pfeffer *et al.*, 2003) are available on the *Vibrio* populations in the environment. These populations can be found in seawater, shellfish, fish and sediment. Their abundance in sediment and seawater was mainly correlated with organic matter, zooplankton concentrations, salinity and temperature. Pathogenic *Vibrio* spp are generally found mixed with innocuous *Vibrio* spp. However, each *Vibrio* sp may have a particular behaviour and must be specifically traced to discover its ecological niches. In this study, we investigated the presence and abundance of *V. aestuarianus* in relationship with environmental parameters, in sediment and oyster haemolymph over two years on two oyster farms in France.

Materials and methods

Sampling sites

Sampling was conducted at Fort Espagnol in Rivière d'Auray (2°58'O and 47°36'N) and Viviers Beg Ar Vill in Aber Benoît (4°36'O and 48°36'N), two estuarine regions in France where oyster farming is highly developed. The Rivière d'Auray represents the west part of the Gulf of Morbihan in South Brittany. The Rivière d'Auray contains 11.75 million cubic meters of seawater. The tidal range is between 4.5 m (upstream) and 5 m (downstream). The tidal flux causes a renewal of 50 % of the Gulf's water every 10 days (20 tides).

Aber Benoît is an 8-km long estuary river situated in Northwest Finistère in Brittany. The average water flow is about $0.418 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$. The major part of the river consists of a basin of 12 km long with 14 km^2 of surface and open to the sea. Both sites are subjected to terrestrial influences through

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

catchment areas of moderate surface and are convenient for breeding oysters due to the presence of phytoplankton blooms (Fig.36).

Sample collection

Three bags containing 250 two-year old oysters were laid on 50 cm high tables on each sample site. Sampling was performed at low tide in 2007, (June, July and August and in September) and in 2008 (February, March, May and June). At both sites and on each date, 10 oysters were randomly sampled per bag and three replicates of sediment (5 cm depth) were taken with a 50 ml plastic tube (Polypropylene centrifuge tube, VWR international) below the oyster tables and three others were sampled 30 m away from the tables. The water temperature and salinity were measured on site with a salinometer (WTW, LF340-B). The pH was also monitored using a pH meter (WTW pH 340).

Sample treatment

For each site the sediment samples (2x3 replicates) and the oyster samples (3x10) were processed within 12 h of collection, following aseptic techniques. Haemolymph was extracted from the oysters using a 1-ml plastic syringe and stored individually in micro-tubes. Each haemolymph sample was observed with an optical microscope to check the presence of haemocytes before dilution.

Ten grams of each sediment sample were suspended in 10 ml of sterile filtrated seawater, homogenized by vortexing for 5 min and the supernatants were diluted 1000-fold in seawater. Both sediment and haemolymph dilutions were spread-plated on marine agar (Difco) for the culturable heterotrophic bacterial count. Thiosulfate-citrate-bile salt-sugar agar (TCBS, Difco) was used for culturable *Vibrio* populations. This medium is used to isolate and cultivate the major *Vibrio* populations even if some strains including *V. aestuarianus*, cannot grow on it. Colonies were counted after incubation for 48 H at 20 °C to avoid the largest colonies covering over the smallest ones.

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

Digoxigenase-labelled probe and colony-blot hybridization

The specific count of *V. aestuarianus* was determined by a hybridisation technique using a specific *V. aestuarianus* 176-bp fragment probe targeting the *gyrB* gene of this *Vibrio* species on marine agar isolates. *In silico* this fragment had 94 % similarity with the closest species, *V. pacinii* (AB298264) and 82 % with *V. splendidus* (AJ577824). The digoxigenine-labelled probe was then PCR amplified with the following oligonucleotide sequences: Vaest gyrdir (positions 307-330): 5'-TCTTTCCTAAACTCTGGCGTATGC-3' and Vaest gyrev3 (positions 459 to 482): 5'-ATGCCATCTTCTTCACGAGTGTGG- 3' by using the DIG high prime DNA labelling and detection starter kit I (Roche Applied Science). Specificity was demonstrated by colony hybridization using culture collection strains of *V. aestuarianus* and other related *Vibrio* species.

Colony-blot were prepared from bacteria growing on marine agar for 48 h at 20 °C. First, the plates were incubated for 30 min at 4 °C. Colonies were transferred to a nylon membrane (HybondTM-N+, Gehealthcare) by overlaying agar plates for 1 to 3 min. Membranes were placed on Whatman paper saturated with denaturing buffer and alkaline lysis with proteinase K treatment was carried out as previously described (Wright *et al.*, 1993). Membranes were incubated for 2 h at 42 °C in 12.5 ml of hybridization buffer containing formamide (50 %) (Sigma Aldrich), SSC (5X) and sodium lauryl sulphate (0.1 %). Hybridization was done overnight at 42 °C, followed by membrane washing once in SSC (2X) with SDS (0.1 %) for 15 min at room temperature and twice in SSC (0.5X) and (0.1X) with sodium dodecyl sulphate (0.1 %) for 15 min at 65 °C. Alkaline phosphatase activity was assayed with nitroblue tetrazolium (VWR International) (0.3 mg ml⁻¹) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP Biochemica VWR International) (0.2 mg ml⁻¹).

Sediment DNA extraction

To detect the presence of *V. aestuarianus* in the sediment by PCR, DNA was extracted according to (Zhou *et al.*, 1996), with some slight modifications. DNA was extracted according to this SDS-based

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

lysis method and was suspended in 500 μl of sterile deionised water. Finally, the DNA was purified with the Wizard® DNA Clean-Up System (Promega, Madison) according to the manufacturer's instructions and was diluted to 10 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ for PCR amplification.

Bacterial DNA extraction

Three colonies, which were isolated from sediment and one of those isolated from oyster haemolymph after *V. aestuarianus*-specific colony hybridization were grown for 24 h in marine broth and subjected to DNA extraction. Cells from the marine broth cultures were harvested and re-suspended in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5). The cell pellets were treated with 1% SDS and proteinase K (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$), incubated for 1 h at 55°C and then NaCl (0.7 M) was added. The aqueous phase was treated successively with phenol-chloroform and chloroform, respectively. The resulting DNA was precipitated with 0.6 volume of isopropanol, washed with 70 % ethanol, air-dried and finally dissolved in milli-Q water.

PCR amplification

To detect *V. aestuarianus* in the sediments sampled in June to September 2007 and February 2008 for each site, *V. aestuarianus* specific PCR was performed by nested PCR with DNA directly extracted from the sediment. First, the 16S rDNA gene was amplified using the universal eubacterial primers, E8F and 1492R (Weisburg *et al.*, 1991). Amplification was performed in a 25- μl volume consisting of 10 ng of sediment DNA, 2 μM of each primer, 4 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl_2 , 1 U AmpliTaq DNA polymerase (Invitrogen, life technologies) with its buffer and an appropriate volume of sterile Milli-Q water. The amplification was carried out in a thermal cycler (Biorad) with initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 30 cycles of amplification (denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 54 °C for 1 min and extension at 72°C for 1 min 30 s. Finally the samples were kept at 72 °C for 7 min as the final extension. The PCR-amplified products were diluted 10-fold and

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

a second PCR amplification was performed using *V. aestuarianus* 16S rDNA specific primers: Vaest 64-99 dir 5'- GAGCGGTTACATTTCAAACGTTGCTTTTGAAGATG-3' and Vaest 664-683rev 5'- CCTCTACAGTACTCTAGTCC - 3' in 25- μ l volume consisting of 1 μ l of the diluted PCR product and the same concentration of the other parameters as for the first PCR. The amplification programme was the same except for the annealing temperature, which was at 65 °C.

To confirm the result obtained by colony-blotting, PCR was performed on extracted bacterial DNA to amplify the 16S rRNA gene and the *gyrB* gene of *V. aestuarianus* using the same programme as before, with 300 ng and 500 ng of chromosomal DNA for 16S rDNA PCR and *gyrB* PCR, respectively.

Cloning and sequencing of 16S rRNA gene

To confirm the specific PCR results, 16S rRNA genes of the three colonies isolates from sediment (07/058, 07/059, and 07/061) and one of those isolated from the oyster haemolymph (07/118) were amplified using the universal eubacterial primers E8F and 1492R. The amplified products were cloned into the PCR II plasmids using the TA cloning Kit (Fisher Scientific SA, France) according to the manufacturer's instructions. Three clones per strain were chosen for sequencing. The sequencing was performed by the genomic service company COGENICS™. Sequences were compared to the GenBank database using online software and the Basic Local Alignment Search Tool algorithm (BLAST) (Altschul *et al.*, 1997).

Statistical analysis

Analysis of the results and trends in *V. aestuarianus* occurrence in sediment and haemolymph samples, with respect to changes in the physicochemical parameters of water (e.g. temperature, salinity and pH) was carried out using Microsoft Excel and STRATGRAPHICS Plus software,

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

version 5.1. Bacterial concentrations were log-transformed for one-way ANOVA and multiple regression analysis, using temperature, salinity and pH values.

Results

Seasonal abundance of total cultured heterotrophic bacteria, TCBS *Vibrio* and *V. aestuarianus* populations

The culturable counts of heterotrophic bacteria (HB), TCBS *Vibrio* (TV) and *V. aestuarianus*-like bacteria detected by colony blot (Vaest) were performed over two years in two oyster farms in Aber Benoît (Fig.41) and Rivière d'Auray (Fig. 42). Bacterial counts in sediment samples under and away from the tables were not significantly different. Analyses were then conducted using the combined values. HB, TV and Vaest showed similar seasonal trends, with highest concentrations during the summer months. The HB counts fluctuated between 3×10^4 and 1×10^8 CFU ml⁻¹ in haemolymph, and between 1×10^4 and 3×10^6 CFU g⁻¹ in sediment in Aber Benoît. At Rivière d'Auray their concentrations varied between 6×10^3 and 4×10^6 CFU ml⁻¹ in haemolymph while they ranged from 5×10^4 to 6×10^6 CFU g⁻¹ in the sediment.

Throughout the survey, TCBS *Vibrio* (TV) were detected both in sediment and in haemolymph of oysters in both areas. At Rivière d'Auray, their counts were about 1×10^2 - 3×10^4 CFU ml⁻¹ in the haemolymph, with the highest concentrations in July and August 2007 (water temperature 19-22 °C). In sediment samples the counts were about 2×10^3 - 1×10^5 CFU g⁻¹, with the highest counts in June through August. In June 2008 the TV counts in oyster haemolymph and in sediment fell by one log. The proportion of TV in relation to HB in the sediment ranged from 0.1 % in February 2008 to 10 % in June 2007. In the haemolymph its relative percentage varied between 0.01 % in June 2008 and 1 % in June 2007.

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

Fig.2

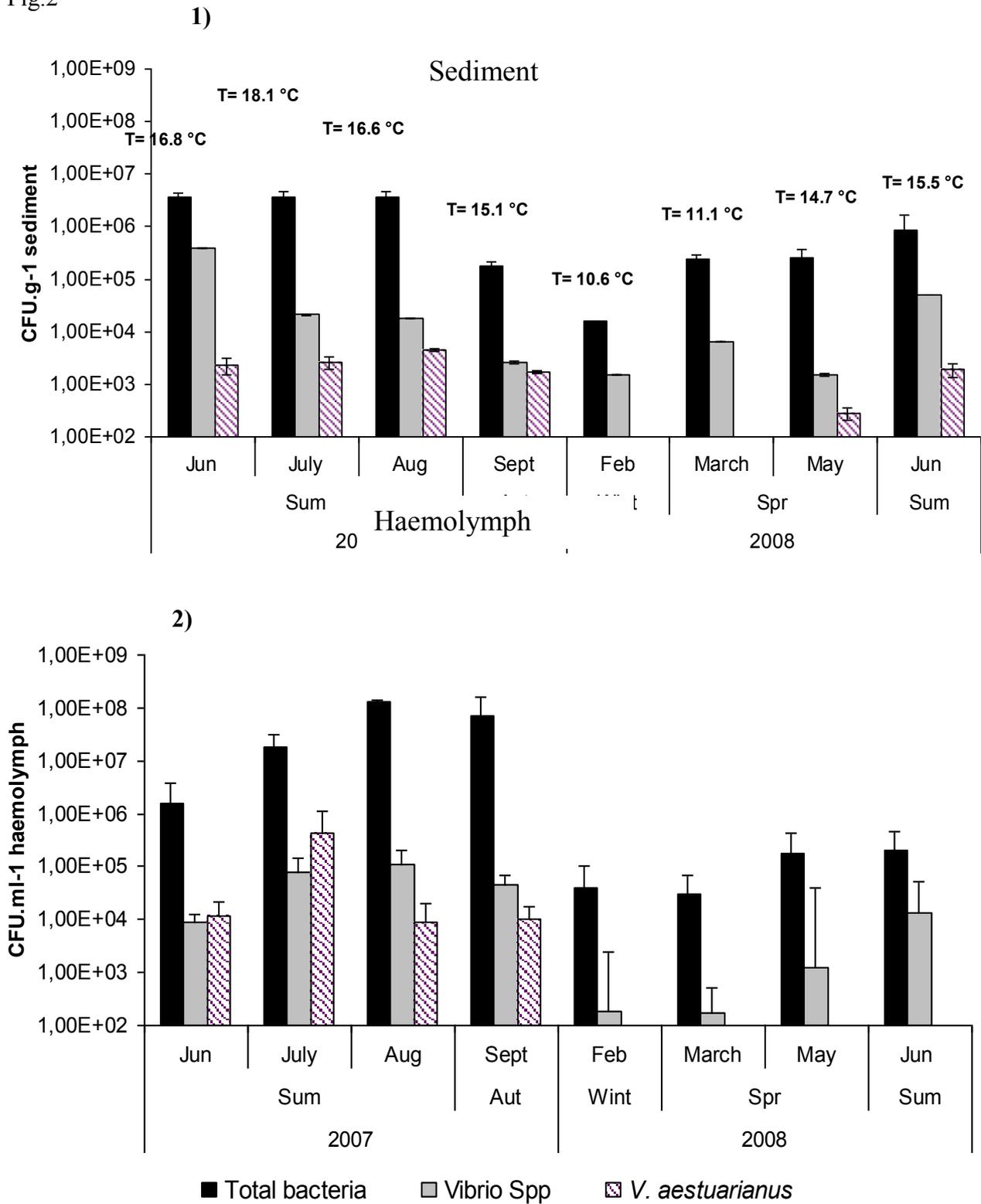


Figure 41 : Culturable heterotrophic bacteria, TCBS *Vibrio* and *V. aestuarianus* counts in sediment (1) and the haemolymph (2) of oysters in Aber-Benoît over time. The water temperature on sampling dates is shown.

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

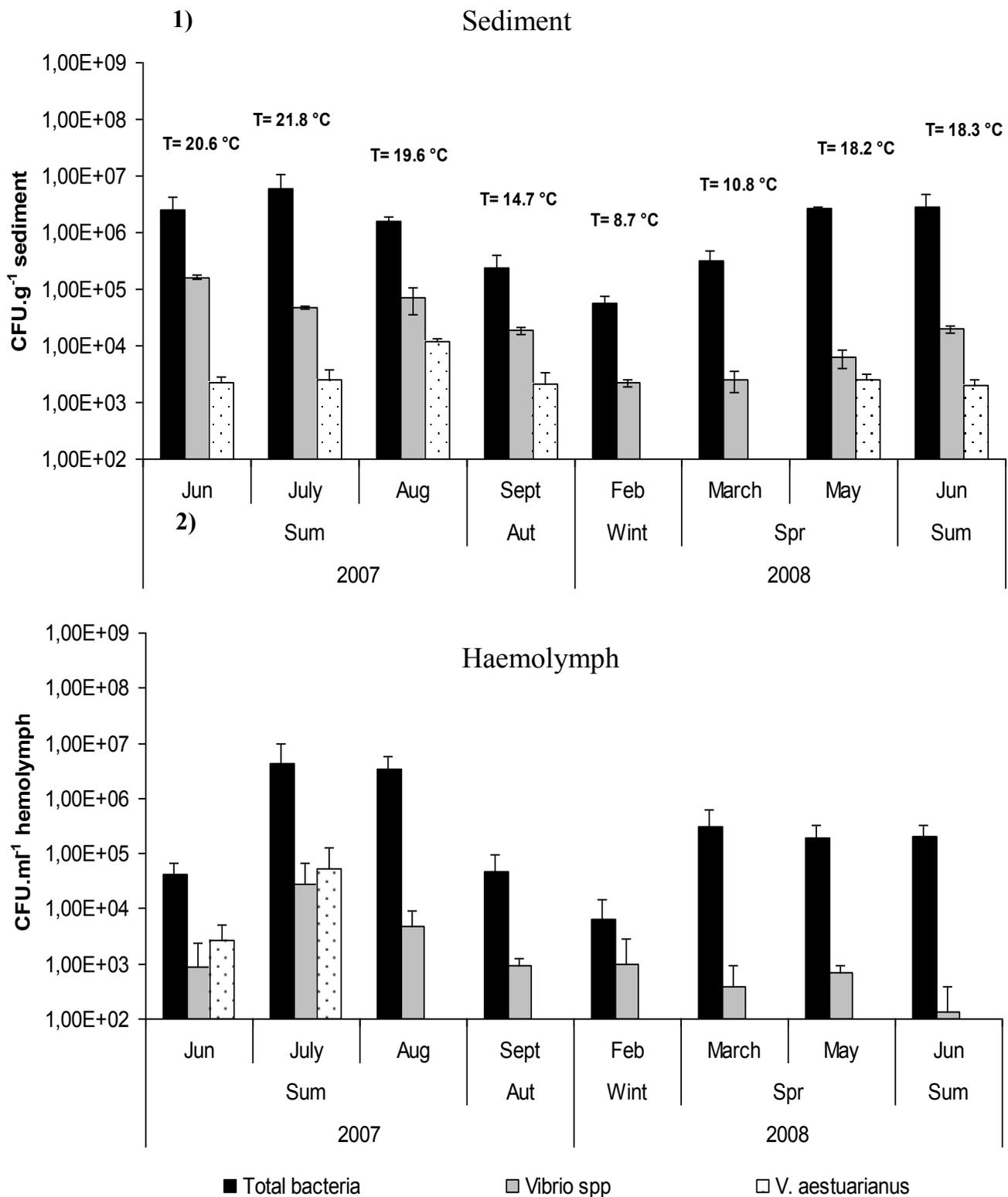


Figure 42 : Culturable heterotrophic bacteria, TCBS *Vibrio* and *V. aestuarianus* counts in sediment (1) and the haemolymph (2) of oysters in Rivière d'Auray over time. The water temperature on sampling dates is shown.

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

TV concentrations were typically higher in Aber Benoît, and ranged from 2×10^3 to 1×10^5 CFU ml⁻¹ in haemolymph and from 1×10^3 to 3×10^6 CFU g⁻¹ in sediment. As in Rivière d'Auray, the TV counts were higher in the summer period in both sampling sites, with the highest concentrations observed in June 2007 for sediment and in June to August for the haemolymph. The lowest occurrence of TV in haemolymph was observed in February and March 2008. The percentage of TV fluctuated within the same range as in Rivière d'Auray.

Similar to vibrio populations, Vaest was subject to the same seasonal fluctuations. In Rivière d'Auray, it was detected in the summer of 2007 in sediment and haemolymph. In the sediment, concentrations ranged between below the limit of detection (10^{-3} CFU g⁻¹) and 1×10^4 CFU g⁻¹. In haemolymph it occurred only in June and July at concentrations of 2×10^3 CFU ml⁻¹ and 5×10^4 CFU ml⁻¹, respectively, while it remained countable in the sediment until September. No *V. aestuarianus* was detected in February and March 2008 in either site. Vaest appeared again in May and June 2008 in sediment but not yet in haemolymph.

In Aber Benoît, the Vaest concentrations in sediment were about 10^3 CFU g⁻¹ from June to September 2007, and in May and June 2008. As in Rivière d'Auray, it was not possible to detect Vaest either in the sediment or in the haemolymph in February and March 2008. Its concentration in haemolymph in June, to September 2007 varied between 8×10^3 CFU.ml⁻¹ and 4×10^5 CFU.ml⁻¹, with the highest values recorded in July when it exceeded the TV counts, as in Rivière d'Auray. In May and June 2008 Vaest was not detected in the haemolymph, while the sediment samples harboured a concentration of 10^2 CFU g⁻¹. The proportion of Vaest in relation to TV and HB varied enormously in the haemolymph and sediment of both locations and was about 1 % of HB in July.

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

Physico-chemical parameters

V.aestuarianus cultured counts (Vaest) in sediment and haemolymph of oysters were compared with environmental parameters such as temperature, salinity and pH of the water column. In Rivière d'Auray a higher salinity was observed from June to September (30-35) in comparison with February, March and May (22-27). The water pH ranged between 8 and 8.60 with the lowest value for August 2007. In Aber Benoît, the salinity did not vary greatly between spring, autumn and summer months, ranging between 32-33. The water temperature in Aber Benoît varied between 15 and 18 °C during the spring, autumn and summer seasons and never reached 20 °C during summer (Figs 41 and 42). The pH was maintained around 7.9 ± 0.1 . We used multiple regression analysis to compare \log_{10} cultured TV and \log_{10} cultured *Vaest* abundance with environmental parameters.

A moderate positive relationship was observed between \log_{10} cultured *Vaest* concentrations in haemolymph and the water temperature. Correlation coefficients for the Aber Benoît and Rivière d'Auray sites, respectively, were 0.6972 ($p < 0.001$) and 0.5083 ($p = 0.0548$) (Table 13). When considering semi-partial correlation, this parameter explained about 89 % and 76 % of the variability of cultured *Vaest* counts, respectively.

There is also a relationship between temperature and the sediment *Vaest* concentrations at both sites. The correlation coefficients were 0.68 ($p < 0.0032$) for Aber Benoît and 0.3785 ($p < 0.0047$) for the Rivière d'Auray. The influence of temperature on sediment samples could reach 99 % in Aber Benoît and 95 % in the Rivière d'Auray.

Salinity and pH were much weaker factors than temperature in determining the prevalence of *Vaest* at both sites. Indeed, we observed no significant correlation between salinity with \log_{10} cultured *Vaest* abundance, neither in haemolymph nor in the sediment of both sites. Nevertheless, a moderate, but negative correlation was found, as shown by the correlation coefficients in Table 13 between pH and *Vaest* counts either in haemolymph or in the sediment.

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

Table 13 : Results of multiple regression analysis of log₁₀ cultural *V. aestuarianus* counts in haemolymph and sediment versus environmental parameters at Aber-Benoît (AB) and Rivière d'Auray (RA).

Independent variable	regression coefficient		squared semi-partial correlation		P-value	
	Hemolymph	sediment	Hemolymph	Sediment	Hemolymph	sediment
Temperature AB	0.69 72	0.6823	89%	99%	P < 0.001	0.0032
Salinity AB	-0.1914	-0.1914	2.255%	0.03%	0.0726	0.8129
pH AB	-0.9971	-0.9971	8.699%	0.761%	0.0684	0.8849
Temperature RA	0.5083	0.3785	76.13%	95.52%	0.0548	0.0047
Salinity RA	-0.5084	-05067	7.973 %	0.215%	0.5837	0.8002
pH RA	-0.9833	-0.9902	1.097%	4.433%	0.4660	0.2867

The log₁₀ TV counts, in haemolymph and sediment were positively correlated in Aber Benoît to the water temperature, while in the Rivière d'Auray its influence was nominal (Table 14). When considering semi-partial correlation, this parameter explained about 43 % and 58 % of cultured TV counts in haemolymph and sediment respectively.

Table 14 : Results of multiple regression analysis of log₁₀ cultured *Vibrio* spp counts in haemolymph and sediment versus environmental parameters at Aber-Benoît (AB) and Rivière d'Auray (RA)

Independent variable	regression coefficient		squared semi-partial correlation		P-value	
	Hemolymph	sediment	Hemolymph	Sediment	Hemolymph	sediment
Temperature AB	0.69 72	0.69 72	93.8%	91%	0.001	0.2058
Salinity AB	-0.1994	-0.1194	0.2361%	8.90%	0.8275	0.6601
pH AB	-0.9971	-0.9971	5.948%	0.003%	0.3074	0.9930
Temperature RA	0.4015	0.4015	43.075%	57.527%	0.3247	0.0851
Salinity RA	-0.5013	-05013	9.5%	12.382%	0.6261	0.3504
pH RA	-0.9958	-0.9958	47.425. %	30.1%	0.3043	0.8453

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

PCR with *V. aestuarianus* 16S RNA gene specific primers

Nested-PCR was used to detect the presence of *V. aestuarianus* in the sediment at Aber-Benoît and Rivière d'Auray. The results showed that the oyster table sediments, as the control sediments, were positive for both, the Aber Benoît (1) and Rivière d'Auray (2) sites. The intensities of the bands were almost identical in Rivière d'Auray, while there were some variations in Aber Benoît.

Identification of isolated *V. aestuarianus* strains

The colonies detected on marine agar by colony blotting were very small when originating from sediment, while they were bigger when originating from haemolymph. Although Vaest detection, performed by our species-specific probe via colony-hybridization, allowed culturable strains of this bacterium to be quantified, it was difficult to isolate it from the marine agar plate when cultured were made from sediment samples. Indeed, after the membrane transfer to marine agar, the colonies spread out on the agar medium and the larger ones sometimes covered the smallest ones. Thus it became difficult to find Vaest colonies when they were very small in number. Nevertheless a total of 21 strains resembling Vaest colonies were isolated on marine agar from Aber Benoît, out of which 3 came from sediment and 18 from haemolymph. The DNA was later extracted and the partial sequences of 16S rRNA and *gyrB* genes were amplified with *V. aestuarianus* specific primers. The affiliation of strains from haemolymph to *V. aestuarianus* was confirmed but not that of strains from sediment. Indeed the two types of PCR were positive for all of the 18 oyster and the 3 sediment strains. To confirm this result, the 16S rRNA gene of the 3 strains isolated from sediment, 07/058, 07/059, 07/061 and one strain from haemolymph (07/118) was cloned and sequenced. The 07/058, 07/061 and 07/118 sequences presented 100 % homology with *V. aestuarianus* sp *francensis* (AJ845014), while the 07/059 sequence presented 99 % homology with the same strain.

Discussion

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

Here we used an oligonucleotide hybridization with the *gyrB* gene probe to detect and quantify cultured *V. aestuarianus* in *C. gigas* haemolymph and sediment samples at two estuarine sites in France. The colonies detected by this method undoubtedly belonged to *V. aestuarianus*. The sensitivity of this method depended on the proportion of *V. aestuarianus* in the total culturable bacterial population. The threshold was 10^3 CFU.g⁻¹ in sediment over the year and 10^3 CFU.ml⁻¹ in haemolymph in the summer and 10^2 in winter.

The drop in *Vibrio* populations and the absence of *V. aestuarianus* during winter were consistent with other studies which showed that *Vibrio* concentrations could fall dramatically in winter (Thompson *et al.*, 2004b). For example, the levels of *V. vulnificus*, *V. cholerae* and *V. parahaemolyticus* were much lower in winter than in summer or often undetectable (Ayres & Barrow, 1978; Oliver *et al.*, 1983; Oneill *et al.*, 1992). Nevertheless, Fukushima and Seki (2004) recovered *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* from the sediment and water of coastal and brackish environments, respectively, using the most probable number count method. Thus the detection and recovery of a bacterium depends not only on the environmental conditions, but also on the method used. The lower temperatures may be incriminated in this disappearance. Indeed, as shown by the estimated regression coefficient in a linear multiple regression using environmental parameters, *V. aestuarianus* as well as TCBS *Vibrio* ssp counts in sediment were positively correlated with water temperature, which appeared to greatly influence culturable bacterial concentrations. A similar influence was previously reported by (Parveen *et al.*, 2008) for *V. parahaemolyticus*, with a high correlation coefficient for temperature, which explained 68% of the variation of this species. Thus the HB, TV and VB concentrations in the sediment of both sites were similar during the spring and summer months, while temperatures were on average 1.5°C higher in Rivière d'Auray. At Aber Benoît, they were at least 10 times greater in haemolymph during June to August 2007 in comparison to Rivière d'Auray.

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

Studies demonstrated that salinity highly influences the dynamics and physiology of several *Vibrio* species (Soto *et al.*, 2009). A positive correlation between *Vibrio* species and seasonal salinity was shown by several authors (Fries *et al.*, 2008; Hsieh *et al.*, 2004; Hsieh *et al.*, 2008), although other authors found temperature to be a more important factor (Pfeffer *et al.*, 2003). For example, with *V. parahaemolyticus*, Parveen *et al.* (2008) found a significant relationship between salinity and counts of this bacterium while other studies did not. As noted by these authors this may have resulted from the difference in the range of observed salinity levels. The tolerance to salinity of the *Vibrio* species under consideration must also be taken into account.

No correlation was found between pH and the *Vibrio* concentrations, probably because the variation in pH was too weak (7.5 to 8).

The fact that *V. aestuarianus* was absent in sediment in February and March may be explained by low temperature, so that the concentration of the remaining cells was below the limit of detection (10^3 CFU g⁻¹ dry sediment). However, using specific PCR, it was detected in the sediment samples of the two sites in March when the temperature remained low, even though their intensity levels were lower than in the June samples. These results suggest that *V. aestuarianus* is a permanent resident of both areas. One possible reason why they could not be cultured is that *Vibrio* species can enter into a VBNC (viable but non-culturable) state in response to environmental stresses, including nutrients depletion, pH, salinity and low temperature (Amel *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Du *et al.*, 2007; Jiang & Chai, 1996; Oliver, 1995; Zhong *et al.*, 2009) (Ramaiah *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2008). The seasonality observed in culturable concentrations of *V. aestuarianus* in sediment suggests that this bacterium could survive in the sediment in a VBNC state when the environmental conditions are unfavourable and rise again under favourable conditions. The persistence of *Vibrio* species in the environment is also backed by their relationship with benthic and plankton populations. Indeed, *Vibrio* spp. living in marine and estuarine environments can survive by attaching to and using the chitin exoskeleton of benthic and planktonic crustaceans such as copepods (Bhowmick *et al.*, 2007;

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

Gugliandolo *et al.*, 2008; Harriague *et al.*, 2008; Pruzzo *et al.*, 1996; Rawlings *et al.*, 2007; Seeligmann *et al.*, 2008; Vezzulli *et al.*, 2008). It has not yet been demonstrated that *V. aestuarianus* binds to plankton, however, analyses of its genome confirms the presence of chitinase genes (data not shown), which suggests some relationship with crustaceans.

After August, *Vibrio* populations decreased and *V. aestuarianus* was no longer detected in haemolymph in Rivière d'Auray, while the sediment still harboured populations at a level of 10^3 - 10^4 CFU g⁻¹. Therefore, it is likely that another factors other than temperature could affect the occurrence of this bacterium in haemolymph. Its persistence depends also on the immune and physiological status of *C. gigas*. Gametogenesis induces profound modifications in the haemocyte parameters of bivalves (Cheng, 2000; Chu, 2000) and oysters seem to be more sensitive to infection during this period (Samain & McCombie., 2008). Therefore the absence of *V. aestuarianus* and the decrease in *Vibrio* populations in the haemolymph of oysters could be due to the immune system of *C. gigas* recovering after spawning, which occurred in July 2007 in Rivière d'Auray, but never in Aber Benoît.

In any case, not all bacteria presented in water can penetrate, grow and thrive in molluscs (Beleneva & Zhukova, 2006) even if the haemolymph of Pacific oysters is particularly permeable to bacteria. The penetration and persistence of bacteria in their hosts may depend on the presence of some specific genes in the bacteria. For example, Paranjpye *et al* (Paranjpye *et al.*, 2007) showed that *pilA*-encoded type IV pili were involved in the persistence of *V. vulnificus* in oysters and served in opportunistic infections. A type IV mannose-sensitive haemagglutinin (MSHA)-like pilus promotes and increases the presence of *V. cholerae* El Tor strains in bivalve hosts (Pruzzo *et al.*, 2005). Analysis of the genome sequence of *V. aestuarianus* revealed that it possessed the MSHA-like gene (data not shown).

In conclusion, our hybridisation method allowed *V. aestuarianus* strains to be detected and quantified in sediment and the haemolymph of oysters from two French oyster farms in Brittany.

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

We showed a seasonal trend in both sites, correlated mainly with temperature. In haemolymph the presence of *V. aestuarianus* could be affected by the immune status of the oysters. Interestingly, even when present in high concentrations (up to 10^5 mL⁻¹) in haemolymph, this bacterium did not induce mortality. This feature proves the capacity of oysters to tolerate and to control *V. aestuarianus*, among other bacteria, in order to avoid becoming infected.

From this study, several questions need further investigation. *In vitro* experiments to verify the ability of *V. aestuarianus* to enter a VBNC state, its ability to use chitin and further environmental investigations integrating water, phytoplankton and copepods would be necessary to create a circulation model between different biotopes. In addition, a gene typing method should be developed to find out if the *Vibrio aestuarianus* strains in sediment and oysters are identical or not. That should permit the real risk of sediment due to the presence of *V. aestuarianus* to be estimated.

Acknowledgements

This work was supported by Brittany Region and the French Research Institute for Exploitation of the Sea (IFREMER). We are grateful to Marie-Josée Garet Delmas and Agnes Youenou for their technical assistance.

References

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402
- Amel BKN, Amine B, Amina B (2008) Survival of *Vibrio fluvialis* in seawater under starvation conditions. *Microbiological Research* 163:323-328
- Ayres PA, Barrow GI (1978) Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in British coastal waters - Report of a collaborative study 1975-1976. *Journal of Hygiene* 80:281-294
- Beleneva IA, Zhukova NV (2006) Bacterial communities of some brown and red algae from Peter the Great Bay, the Sea of Japan. *Microbiology* 75:348-357

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

- Bhowmick R, Ghosal A, Chatterjee NS (2007) Effect of environmental factors on expression and activity of chitinase genes of vibrios with special reference to *Vibrio cholerae*. *Journal of Applied Microbiology* 103:97-108
- Chen SY, Jane WN, Chen YS, Wong HC (2009) Morphological changes of *Vibrio parahaemolyticus* under cold and starvation stresses. *International Journal of Food Microbiology* 129:157-165
- Cheng TC (2000) Cellular defense mechanisms in oysters. In: *In* Fingerma M. NRe (ed) *Recent advances in marine biotechnology: immunobiology and pathology*. Enfield (USA) Sciences Publishers Inc., , p 43-83
- Chu F-LE (2000) Defense mechanism of marine bivalves. In: *In* Fingerma M. NRe (ed) *Recent advances in marine biotechnology: immunobiology and pathology*. Enfiel (USA) , Sciences Publishers Inc., p 1-42
- Du M, Chen JX, Zhang XH, Li AJ, Li Y (2007) Characterization and resuscitation of viable but nonculturable *Vibrio alginolyticus* VIB283. *Archives of Microbiology* 188:283-288
- Eiler A, Bertilsson S (2006) Detection and quantification of *Vibrio* populations using denaturant gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 67:339-348
- Eiler A, Gonzalez-Rey C, Allen S, Bertilsson S (2007) Growth response of *Vibrio cholerae* and other *Vibrio* spp. to cyanobacterial dissolved organic matter and temperature in brackish water. *Fems Microbiology Ecology* 60:411-418
- Fries JS, Characklis GW, Noble RT (2008) Sediment-water exchange of *Vibrio* sp and fecal indicator bacteria: Implications for persistence and transport in the Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *Water Research* 42:941-950
- Fukushima H, Seki R (2004) Ecology of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in brackish environments of the Sada River in Shimane Prefecture, Japan. *Fems Microbiology Ecology* 48:221-229
- Garnier M, Labreuche Y, Garcia C, Robert A, Nicolas JL (2007) Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microbial Ecology* 53:187-196
- Garnier M, Labreuche Y, Nicolas JL (2008) Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp *francensis* subsp nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Systematic and Applied Microbiology* 31:358-365
- Gugliandolo C, Irrera GP, Lentini V, Maugeri TL (2008) Pathogenic *Vibrio*, *Aeromonas* and *Arcobacter* spp. associated with copepods in the Straits of Messina (Italy). *Marine Pollution Bulletin* 56:600-606
- Harriague AC, Di Brino M, Zampini M, Albertelli G, Pruzzo C, Misic C (2008) Vibrios in association with sedimentary crustaceans in three beaches of the northern Adriatic Sea (Italy). *Marine Pollution Bulletin* 56:574-579
- Hsieh JL, Fries JS, Noble RT (2004) *Vibrio* and phytoplankton dynamics during the summer of 2004 in a eutrophying estuary Conference on Eutrophication and Pathogen Impacts in New Jersey Coastal Bay, New Brunswick, NJ, p S102-S109
- Hsieh JL, Fries JS, Noble RT (2008) Dynamics and predictive modelling of *Vibrio* spp. in the Neuse river estuary, north carolina, USA. *Environmental Microbiology* 10:57-64
- Jiang XP, Chai TJ (1996) Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells. *Applied and Environmental Microbiology* 62:1300-1305
- 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 and Comparative Immunology* 30:367-379

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

- Oliver JD (1995) The viable but non-culturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. *Fems Microbiology Letters* 133:203-208
- Oliver JD, Warner RA, Cleland DR (1983) Distribution of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting vibrios in the marine. *Applied and Environmental Microbiology* 45:985-998
- O'Neill KR, Jones SH, Grimes DJ (1992) Seasonal incidence of *Vibrio vulnificus* in the great bay estuary of New-Hampshire and Maine. *Applied and Environmental Microbiology* 58:3257-3262
- Paranjpye RN, Johnson AB, Baxter AE, Strom MS (2007) Role of type IV pilins in persistence of *Vibrio vulnificus* in *Crassostrea virginica* oysters. *Applied and Environmental Microbiology* 73:5041-5044
- Parveen S, Hettiarachchi KA, Bowers JC, Jones JL, Tamplin ML, McKay R, Beatty W, Brohawn K, DaSilva LV, DePaola A (2008) Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters. *International Journal of Food Microbiology* 128:354-361
- Pfeffer CS, Hite MF, Oliver JD (2003) Ecology of *Vibrio vulnificus* in estuarine waters of eastern North Carolina. *Applied and Environmental Microbiology* 69:3526-3531
- Pruzzo C, Crippa A, Bertone S, Pane L, Carli A (1996) Attachment of *Vibrio alginolyticus* to chitin mediated by chitin-binding proteins. *Microbiology-Uk* 142:2181-2186
- Pruzzo C, Gallo G, Canesi L (2005) Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environmental Microbiology* 7:761-772
- Ramaiah N, Ravel J, Straube WL, Hill RT, Colwell RR (2002) Entry of *Vibrio harveyi* and *Vibrio fischeri* into the viable but nonculturable state. *Journal of Applied Microbiology* 93:108-116
- Rawlings TK, Ruiz GM, Colwell RR (2007) Association of *Vibrio cholerae* O1 El Tor and O139 Bengal with the copepods *Acartia tonsa* and *Eurytemora affinis*. *Applied and Environmental Microbiology* 73:7926-7933
- Samain JF, McCombie H (eds) (2008) Summer mortality of pacific oyster *Crassostrea gigas* The Morest project, Vol
- Seeligmann CT, Mirande V, Tracanna BC, Silva C, Aulet O, Cecilia M, Binsztein N (2008) Phytoplankton-linked viable non-culturable *Vibrio cholerae* O1 (VNC) from rivers in Tucuman, Argentina. *Journal of Plankton Research* 30:367-377
- Soto W, Gutierrez J, Remmenga MD, Nishiguchi MK (2009) Salinity and Temperature Effects on Physiological Responses of *Vibrio fischeri* from Diverse Ecological Niches. *Microbial Ecology* 57:140-150
- Sun FR, Chen JX, Zhong LH, Zhang XH, Wang R, Guo QR, Dong Y (2008) Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*. *Fems Microbiology Ecology* 64:37-44
- Thompson JR, Randa MA, Marcelino LA, Tomita-Mitchell A, Lim E, Polz MF (2004) Diversity and dynamics of a north Atlantic coastal *Vibrio* community. *Applied and Environmental Microbiology* 70:4103-4110
- Vezzulli L, Pezzati E, Repetto B, Stauder M, Giusto G, Pruzzo C (2008) A general role for surface membrane proteins in attachment to chitin particles and copepods of environmental and clinical *Vibrio*. *Letters in Applied Microbiology* 46:119-125
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173:697-703
- Wright AC, Miceli GA, Landry WL, Christy JB, Watkins WD, Morris JG (1993) Rapid identification of *Vibrio vulnificus* on nonselective media with an alkaline phosphatase-labeled oligonucleotide probe. *Applied and Environmental Microbiology* 59:541-546
- Zhong L, Chen J, Zhang XH, Jiang YA (2009) Entry of *Vibrio cincinnatiensis* into viable but nonculturable state and its resuscitation. *Letters in Applied Microbiology* 48:247-252

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

Zhou JZ, Bruns MA, Tiedje JM (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology* 62:316-322

II. Caractérisation des différents isolats de *V. aestuarianus*

Pour s'assurer que les méthodes de détection et de quantification reconnaissent spécifiquement des souches *V. aestuarianus* et pour étayer l'hypothèse selon laquelle le sédiment servirait de réservoir, un certain nombre d'entre elles ont été collectées dans le sédiment et les huîtres et caractérisées d'un point de vue génotypique et phénotypique.

II-1 Matériels et Méthodes

II-1-1 Isolement des souches

Les souches étudiées dans cette partie ont été isolées après étalement et culture des bactéries totales du sédiment sur marine agar (Difco TM Marine Agar 2216). La méthode du colony-blot n'a pas permis d'isoler des souches après passage de la membrane sur les colonies, ainsi la plupart des souches ont été isolées à partir de boîtes qui n'ont pas été utilisées pour cette technique et en se basant sur les caractéristiques morphologiques des colonies de *V. aestuarianus* sur marine agar. Néanmoins deux souches ont pu être isolées après le colony-blot. Au total, 98 souches ont été récoltées, 60 provenant du sédiment, 18 des huîtres vivantes et 20 des huîtres moribondes. Ensuite, les souches ont été à nouveau repiquées sur du milieu marine agar avant un criblage par colony-blot. Les souches positives ont été conservées à -80°C dans du DMSO 5%.

II-1-2 confirmation de l'appartenance à l'espèce *V. aestuarianus*

II-1-2-1 Amplification par PCR des gènes de l'ARN ribosomique 16S et de la gyraseB de *V. aestuarianus*

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

Après colony-blot, les souches positives ont subi un second criblage par amplification. Les amorces utilisées sont spécifiques des gènes de l'ADNr 16S et de la gyrase B de *V. aestuarianus*. Le milieu réactionnel (25µL) est composé de 1,5 mM de MgCl₂, de 1x tampon *Taq* Bioline, de 2 unités de TAQ polymérase Bioline, de 4 mM de dNTP, de 2 µM de chaque amorce et de 100 à 300 ng d'ADN matrice. La réaction d'amplification est effectuée à l'aide des thermocycleurs Biorad et Eppendorf. Après une phase de dénaturation initiale de 5 minutes à 94°C, l'ADN est dénaturé 30 secondes à 94°C, les amorces sont hybridées à 45-65°C (selon le couple d'amorce) pendant une minute, puis l'ADN est polymérisé à 72°C pendant 30s secondes/ 500 nucléotides à polymériser. Après 35 cycles, une étape finale de polymérisation à 72 °C est réalisée pendant 7minutes. Les produits de PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 1% (PCR 16S) et à 2% (PCR *gyrB*) contenant du TBE 1X (TBE 10X : Tris base 108g.L⁻¹, Acid borique 55g.L⁻¹, EDTA 8,3g.L⁻¹).

II-1-2-2 Clonage et séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S

Le gène 16S de quelques souches a été amplifié à l'aide d'amorces universelles des eubactéries (Tableau 15). Le mélange réactionnel et les cycles de PCR sont comparables à ceux des deux types de PCR ci-dessus. Seule la température d'hybridation change. Le clonage a été réalisé à l'aide du Kit Topo TA Cloning Kit K4650-40 (INVITROGEN) qui comprend le plasmide pCR II-TOPO, les réactifs, ainsi que les cellules compétentes. Pour chaque clonage, 1 µl de tampon 10X, 2 µl de vecteur pCR II (25ng/µl) 9 µl d'eau stérile et la T4 DNA Ligase (1 µl) sont ajoutés à 1 µl de produit de PCR et laissés au moins 4 heures à 14°C puis conservé dans la glace. Les produits issus de la ligation ont été clonés dans *E.coli* (2µl de produit de ligation dans 50µl de cellules compétentes) par choc thermique pendant 2 min à 42°C et 5 min dans la glace. Les bactéries sont ensuite mises en culture dans 250µl de milieu de culture S.O.C. et incubées 1 heure à 37 °C sous agitation. La sélection des clones positifs a été réalisée après incubation de suspensions bactériennes sur du milieu LB contenant de l'ampicilline (100 µg/ml), du X-Gal (40mg/ml) et de l'IPTG (100 mM). Les plasmides sont extraits à l'aide du kit E.Z.N.A miniprep selon les recommandations du fournisseur et la présence de l'insert (1.5 kb) est vérifiée par digestion par l'enzyme de restriction *EcoR*I. Les plasmides sont ensuite envoyés pour séquençage à Cogenics. Les séquences ont été analysées à l'aide du logiciel BioEdit (copyright© 1997-2007 Tom Hall Ibis bioscience Carlsbad, CA92008) et comparées par blast à la banque de données en ligne via NCBI.

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

Tableau 15 : Amorces utilisées pour les amplifications et tailles des fragments attendus

Gène cible	Amorce dir	Amorce rev	Taille du fragment amplifié	Température d'hybridation
16S universel	Sa dir (aga gtt tga tca tgg ctc ag)	S17 rev (cgg yta cct tgt tac gac)	1590 pdb	54°C
16S spécifique	Vaest 64-99 dir (gag cgg tta cat ttc aaa acg ttg ctt ttg aag atg)	V aest 664-683 rev (cct cta cag tac tct agt cc)	619 pdb	63°C
gyrB spécifique	Vaest gyr rev 3 (tct ttc cta aac tct ggc gta tcg)	V aest 307-330 gyr dir (cca cac tcg tga aga aga tgg cat)	176 pdb	60°C

II-1-3 Caractérisations des souches

II-1-3-1 Tests biochimiques : galerie API 20 E

La colonie de la souche à étudier est mise en suspension dans 5 ml d'eau de mer stérile et incubée pendant 4 h pour obtenir un trouble de 0,5 MacFarland.

Cette suspension est alors distribuée dans les différentes cupules de la galerie API20E et incubée à 20 °C pendant environ 48 h. Les révélations sont réalisées avec les réactifs inclus dans le Kit selon les instructions du fournisseur.

II-1-3-2 Mesure de l'activité protéasique

Test azocaséine

L'activité protéasique des surnageants de culture de chaque souche est mesurée grâce à l'azocaséine. C'est une protéine modifiée chimiquement, résultant de l'association de sulfanilamides aux liaisons peptidiques. Si l'échantillon présente des enzymes protéolytiques, les peptides les plus courts ainsi que les acides aminés de la chaîne carbonée seront libérés. Les groupements sulfanilamides étant de couleur orangée, plus la réaction de protéolyse est forte, plus le nombre de petits peptides et d'acides aminés libérés sera important, générant une coloration orangée plus marquée. L'activité protéasique est déterminée par mesure de l'intensité de coloration grâce à un spectrophotomètre à 440 nm.

Pour chaque souche, 25 µL de surnageant de culture est ajouté à 225 µL d'eau distillée ainsi qu'à 250 µL d'azocaseine (Sigma 5mg.ml⁻¹ dans 50 mM de Tris HCl ; 0,04% NaN₃, pH8). Toutes les mesures sont effectuées en triplicat. Un témoin positif (E24) ainsi qu'un témoin négatif (Albumine) sont réalisés en triplicat. Le mélange réactionnel est incubé à température ambiante pendant 1 heure, puis la réaction est stoppée par ajout de 500 µL d'acide trichloracétique (10% p/v).

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

Après une centrifugation de 4 minutes à 12 000g à 4°C, 500 µL de surnageant est repris par 500 µL de NaOH 1 M. Enfin, les échantillons sont homogénéisés puis l'absorbance est mesurée à 440 nm.

II-1-3-3 Mesure de la virulence par infections expérimentales

Les huîtres *C. gigas* utilisées pour les infections sont âgées de 2 ans et proviennent d'un élevage ostréicole de la rade de Brest (L'Hôpital-Camfrout, Finistère). Elles sont acclimatées dans des bacs contenant de l'eau de mer circulante quelques jours. Avant les expérimentations, le bord droit des huîtres est poncé au niveau du tiers supérieur droit permettant ainsi un accès au muscle adducteur de l'huître. Par la suite elles sont placées dans de l'eau de mer courante pendant au minimum 48 heures. Les infections expérimentales sont réalisées à raison de 20 huîtres par bac et de 3 bacs par condition.

Pour les infections expérimentales, nous avons choisi deux isolats issus de la même huître mais ayant des activités protéasiques très différentes. Les souches bactériennes sont cultivées pendant 24 heures dans du Marine Broth, sous agitation à 19 °C. Après centrifugation 25 min à 1400 g, le culot est repris dans de l'eau de mer stérile. Pour chaque souche la densité optique est mesurée à 540 nm, et le volume est ajusté afin d'obtenir une concentration bactérienne de 10^9 CFU.ml⁻¹. Un volume de 100 µl soit 10^8 CFU est inoculé dans le muscle de chaque huître. Concernant le témoin négatif, les huîtres sont inoculées avec 100 µL d'EMSF. Après injection, les mollusques sont placés dans des bacs contenant 10 l d'eau de mer filtrée maintenue en condition statique avec bullage. La température est maintenue à environ 16°C. Il a été vérifié au préalable que cette température n'avait pas d'influence sur le déclenchement de la maladie par injection contrairement aux huîtres placées sur le terrain. L'eau est changée tous les 3 jours, par de l'eau de mer filtrée et traitée aux UV. Le suivi des mortalités est effectué pendant 15 jours.

II-2 Résultats

II-2-1 Isolement des souches

Au total 98 souches apparentées à *V. aestuarianus* ont été isolées en fonction de leur aspect morphologique sur milieu Marine Agar durant l'étude écologique dans l'Aber Benoît et la Rivière d'Auray. 60 souches proviennent du sédiment avec 3 isolées suite au colony-blot ; et 38 des huîtres vivantes ou moribondes. La première étape a donc consisté à cribler ces échantillons grâce à la méthode du colony-blot. 27 d'entre elles dont 8 du sédiment se sont révélées positives par cette

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

méthode. Toutes les souches s'étant révélées positives au colony-blot ont été soumises à des observations microbiologiques, sur boîte, en microscopie à l'état frais et après coloration de gram. *Vibrio aestuarianus* présente sur Marine agar de petites colonies translucides, rondes, légèrement bombées, à bords réguliers après 48 heures de culture à 19°C. Tous les échantillons testés correspondaient à cette description à l'exception de la souche 07/107 qui présentait de grandes colonies blanches, rondes, plates, à bords irréguliers. L'état frais ainsi que la coloration de gram permettent de mettre en évidence d'une part la mobilité de l'ensemble des souches, d'autre part leur appartenance aux bactéries gram négatif.

II-2-2 confirmation de l'appartenance à l'espèce *V. aestuarianus*

II-2-2-1 Amplification par PCR des gènes de l'ARN ribosomique 16S et de la gyraseB de *V. aestuarianus*

Le colony-blot étant une méthode spécifique utilisant une sonde de 176 bp complémentaire au gène de la gyrase B de *V. aestuarianus*, nous pouvons supposer qu'il s'agisse bien de *Vibrio aestuarianus*. Toutefois, une confirmation par PCR a été nécessaire pour s'assurer de l'appartenance à l'espèce *Vibrio aestuarianus*. Pour cela, nous avons utilisé deux couples d'amorces, l'un cible un fragment de 619 bp du gène de l'ARN ribosomique 16S de *V. aestuarianus* tandis que l'autre correspond aux amorces utilisées dans la synthèse de la sonde pour le colony-blot et génère par conséquent un fragment de 176 bp environ. Les résultats des PCR ont montré que toutes les souches provenant des huîtres sont positives pour les deux PCR. En revanche, des souches issues du sédiment seulement 3 souches nommées 07/058, 07/059, 07/060 sont positives pour les deux PCR. Elles représentent les trois souches isolées directement sur marine agar suite au colony-blot. Les autres avaient été isolées sur base de ressemblance morphologique.

II-2-2-2 Clonage et séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S

Les souches isolées du sédiment donnant des résultats mitigés par amplification PCR, nous avons procédé au clonage et au séquençage de leur gène de l'ARNr 16S ainsi que celui de la souche 07/118 provenant d'une huître moribonde. Les résultats des blasts sur NCBI montrent que les souches dont les PCR pour le 16S et la *gyrB* ont été négatives c'est-à-dire les souches 07/060 (article 2), 07/095, 07/123, 07/124 et 07/125 sont proches des espèces *Bacillus litoralis*, *V. furnisii* et *V. harveyi*, *Psychromonas artica* et *Paenibacillus sp.* Les séquences des trois souches qui ont été isolées

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

directement après colony-blot et non sur base de ressemblance morphologique c'est-à-dire les souches 07/058, 07/059, 07/061, sont identiques avec 99% (07 /059) et 100% d'homologie (07/058 et 07/061) avec la séquence de *V. aestuarianus sp franciensis* (AJ845014) (Tableau 16).

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

Tableau 16 : Les différents isolats et les résultats des PCR et des blasts

Souches	Source d'isolation	PCR spécifiques		Espèce proche et pourcentage de similarité
		PCR spécifique du 16S	PCR spécifique de la <i>gyrB</i>	
07/126	Huître moribonde	+	+	ND
07/127	Huître moribonde	+	+	ND
07/129	Huître moribonde	+	+	ND
07/130	Huître moribonde	+	+	ND
07/132	Huître moribonde	+	+	ND
07/133	Huître moribonde	+	+	ND
07/134	Huître moribonde	+	+	ND
07/135	Huître moribonde	+	+	ND
07/136	Huître moribonde	+	+	ND
07/137	Huître moribonde	+	+	ND
02/041	Huître moribonde	+	+	ND
01/308	Huître moribonde	+	+	ND
07/114	Huître vivante	+	+	ND
07/115	Huître vivante	+	+	ND
07/116	Huître vivante	+	+	ND
07/117	Huître vivante	+	+	ND
07/118	Huître vivante	+	+	100 % <i>V. aestuarianus</i> (AJ845014)
07/122	Huître vivante	+	+	ND
07/138	Huître vivante	+	+	ND
07/058	Sédiment	+	+	100 % <i>V. aestuarianus</i> (AJ845014)
07/059	Sédiment	+	+	99 % <i>V. aestuarianus</i> (AJ845014)
07/060	Sédiment	-	-	99% <i>Bacillus litoralis</i> (AY608605)
07/061	Sédiment	+	+	100 % <i>V. aestuarianus</i> (AJ845014)
07/095	Sédiment	-	-	96% Uncultured gamma proteobacterium clone WA_08f 16S (EF123487)
07/123	Sédiment	-	-	97% Marine psychrotrophic bacterium
07/124	Sédiment	-	-	97% <i>Paenibacillus sp</i>
07/125	Sédiment	-	-	97% Marine psychrotrophic bacterium Mst37 (AJ308372)

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

II.2.2.3. Tests biochimiques : galerie API 20 E

Les tests sont dans l'ensemble très peu positifs et versatiles. L'indole est produit par la majorité des souches à part 07/134, 07/122, 07/137, 07/059B, 07/058A. Les souches 07/106, 07/116, 07/115, 07/117, 07/114, 08/108 quant à elles sont incapables de fermenter le glucose. Les souches 07/126 et 07/137 sont les seules à produire du nitrate, et la 07/137 est l'unique capable de fermenter le mannitol. Enfin, aucune des souches n'est capable de fermenter l'arabinose sauf la 07/135. La souche 02/041 est capable de fermenter le glucose et le saccharose, elle est la seule souche à posséder une gélatinase et la β -galactosidase.

II.2.2.4. Mesure de la virulence par infections expérimentales

Les souches testées présentent une activité azocaséine comprise entre 0,05 et 0,35 $D0/10^8$ bactéries/heure, à l'exception de la souche 07/115 qui ne présente pratiquement aucune activité. A l'inverse la souche 07/114 présente une activité proche de 1 $D0/10^8$ bactéries/heure. Il n'existe pas de lien entre l'origine d'isolement et l'intensité de l'activité (Figure 43).

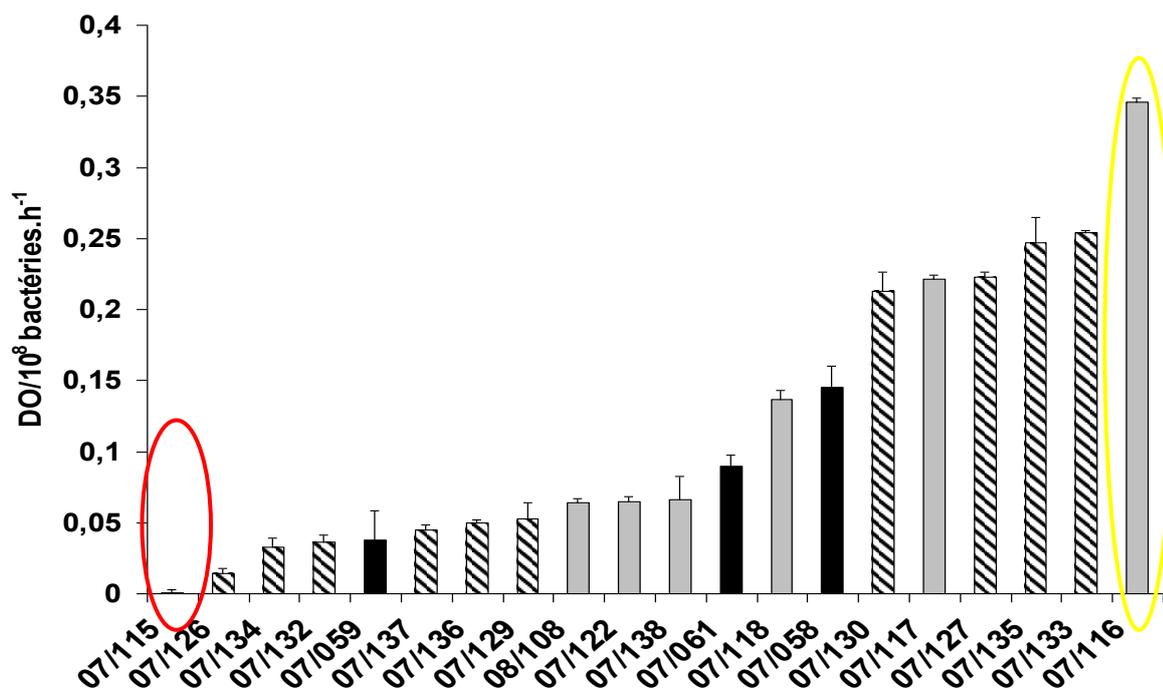


Figure 43 : Activités protéolytiques des surnageants de culture des différents isolats. En noir : les souches du sédiment. En hachuré : les souches d'huîtres moribondes. En grisé : les souches d'huîtres vivantes

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

II.2.2.5 Mesure de la virulence par infections expérimentales

Nous avons testé la capacité de deux isolats provenant d'une même huître vivante, à induire des mortalités chez *C. gigas* par injection d'une suspension de 10^8 bactéries dans le muscle adducteur. Les 2 souches sont positives pour les PCR 16S et PCR gyrB. Le surnageant de culture de la première 07/115 ne présente pas d'activité protéasique alors que celui de la seconde, 07/116, présente une forte activité (Figure 43).

Les infections expérimentales mettent en évidence la forte virulence des 2 souches puisqu'elles provoquent toutes les deux, comme le témoin positif, des mortalités supérieures à 50% en moins de 8 jours. Cependant l'apparition des mortalités provoquées par la souche 07/116 apparaissent de manière plus différée que les mortalités provoquées par la souche 07/115 (Figure 44). Les mortalités induites par le témoin négatif (EMSF) sont inférieures ou égales à 20%.

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

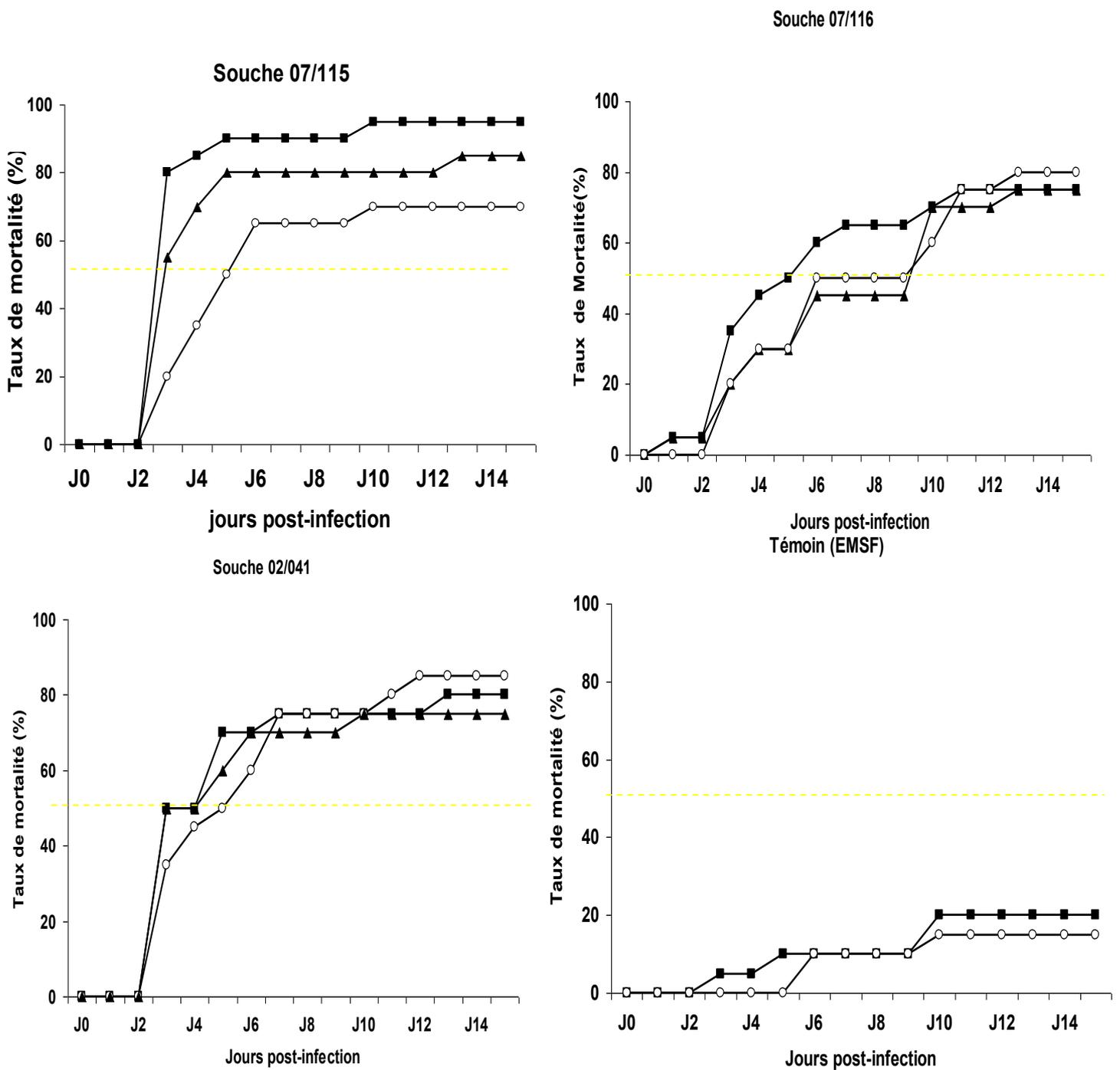


Figure 44 : Cinétiques des mortalités de *C. gigas* injectées au niveau du muscle adducteur (10^8 bactéries par huître, trois réplicats de 20 huîtres testées par souche et deux réplicats de 20 huîtres pour le témoin EMSF).

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

II-3 Discussion

L'objectif de cette partie du chapitre 3 était de caractériser les souches *V. aestuarianus* issues du sédiment et des huîtres. Ensuite de déterminer s'il existe une diversité entre les souches issues de ces deux environnements. Au préalable une étude écologique de cette espèce a été entreprise sur les sites ostréicoles de Vivier de Be ger vil dans l'aber Benoît et de Fort-espagnol dans la rivière d'Auray. Durant cette étude, *V. aestuarianus* a été détecté dans le sédiment et dans l'hémolymphe des huîtres au moyen d'une méthode moléculaire (colony-blot). Cependant, le colony-blot ne permet pas d'isoler les souches de *V. aestuarianus* sur marine agar lorsque l'échantillon est chargé en autres bactéries. En effet comme signalé dans le premier article le sédiment contient une très grande diversité bactérienne comparée à la diversité bactérienne de l'hémolymphe des huîtres. Par ailleurs les échantillons de sédiment donnent après ensemencement sur Marine agar, de petites colonies translucides à peine visibles de *V. aestuarianus*, rendant alors l'isolement difficile après passage de la membrane d'hybridation. Les colonies formées par cette bactérie issue de l'hémolymphe sont par contre plus grandes.

Dans l'ensemble, 93 colonies ont été isolées sur la base de ressemblance phénotypique avec *V. aestuarianus sp franciensis* à partir de l'hémolymphe et du sédiment. Notons que 3 colonies du sédiment ont cependant pu être isolées après colony-blot. Afin de confirmer l'appartenance à l'espèce *V. aestuarianus*, nous avons réalisé un premier criblage par colony-blot à l'aide d'une sonde spécifique du gène de la sous-unité B d'ADN gyrase de *V. aestuarianus*. De ce criblage, 26 colonies se sont révélées positives parmi lesquelles 18 sont issues de l'hémolymphe et 8 du sédiment. Par la suite un second criblage a été réalisé par amplification à l'aide de deux couples d'amorces, l'un spécifique de l'ARNr 16S de *V. aestuarianus* et l'autre spécifique de la *gyrB*. Les résultats pour les deux PCR ont donné des résultats positifs pour toutes les colonies de l'hémolymphe d'huîtres. Seulement 3 colonies du sédiment se sont avérées être positives pour les deux PCR. Nous avons séquencé et analysé le gène ARNr 16S des souches du sédiment ainsi que celui d'une souche de l'huître.

La séquence de l'ARN 16S de l'isolat 07/118 issu de l'huître avait 100 % de similarité avec celui de la souche de *V. aestuarianus* dans la banque des données. De même les séquences du gène de l'ARNr 16S de deux isolats (07/058 et 07/061) du sédiment avaient 100 % de similarité avec cette même souche tandis que la séquence de l'isolat 07 /059 en avait 99%. Le gène de l'ARNr 16S est un gène qui évolue lentement et il possède ainsi des zones très conservées. La lenteur de cette horloge moléculaire est très utile en phylogénie. C'est Woese qui en 1987 proposa l'utilisation de ce gène

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

dans la classification des bactéries. Lorsque deux souches ont au moins 97 % de similarité elles peuvent appartenir à la même espèce mais il faut réaliser des hybridations ADN/ADN pour le confirmer ou séquencer d'autres gènes. En se basant sur ces critères, les souches du sédiment 07/058, 07/059, 07/061 et l'isolat de l'huître 07/118 peuvent être considérés comme appartenant très probablement à l'espèce *V. aestuarianus*. Si globalement le gène de l'ADNr 16S évolue très lentement, il existe certaines zones plus variables, qui permettent de définir des amorces spécifiques. Ainsi les amorces de la région V3 de l'ADNr 16S de *V. aestuarianus* se sont révélées suffisamment spécifiques de cette espèce. Les résultats de la PCR avec ces amorces sur les autres isolats du sédiment ont été négatifs et les résultats ayant été confirmés par les analyses des séquences des gènes de l'ARNr 16S, on peut affirmer que ces trois souches appartiennent à l'espèce *V. aestuarianus*. En revanche, les autres isolats du sédiment, 07/060, 07/095, 07/123, 07/124 et 07/125 après analyse des séquences de l'ADNr 16S, se sont avérés appartenir à d'autres espèces voire d'autres genres et il n'y a pas eu d'amplifications aussi bien pour le gène de l'ADNr 16S que pour le gène de la *gyrB*. Néanmoins, ces isolats ont répondu positivement au premier criblage par colony-blot. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les colonies ont été étalées sur marine agar après la pose de la membrane et qu'il y a pu y avoir mélange avec d'autres colonies. Des homologies de séquences avec d'autres gènes ne sont pas exclues. En effet, en comparant la séquence de la sonde avec la séquence du gène *gyrB* de *Bacillus litoralis* (dont est apparenté, l'isolat 07/060), les deux séquences s'hybridaient *in silico* mais pas au même niveau de la séquence de *V. aestuarianus*. Cette simple complémentarité de séquences est à l'origine des faux positifs. Malheureusement, nous ne disposons pas des séquences de la *gyrB* des autres isolats.

Yamamoto et Harayama (Yamamoto & Harayama, 1996) ont suggéré que les gènes qui ne sont pas transférés horizontalement d'une espèce bactérienne à l'autre peuvent être utilisés dans les analyses phylogénétiques, assurant que seulement 0,7 à 0,8 % de taux de substitution par millions d'années se déroulent au niveau des gènes codant des protéines contre 1 % par 5 millions d'années pour le gène du 16S (Yamamoto & Harayama, 1995). Ainsi d'autres gènes en dehors du 16S sont de plus en plus utilisés dans la taxonomie des bactéries pour pallier le défaut lié à la très faible variabilité du gène de l'ARNr 16S. Les gènes tels que *recA* (Mahenthiralingam *et al.*, 2000), *opcL* (), *rpoD* et la *gyrB* (Le Roux *et al.*, 2004; Tabacchioni *et al.*, 2008; Venkateswaran *et al.*, 1998).

Le gène *gyrB* code pour la sous-unité B de l'ADN gyrase (topoisomérase type II) et il est en copie unique dans les génomes bactériens. Des travaux ont montré sa grande utilité en tant que gène taxonomique dans la phylogénie des *Enterobacteriaceae* (Dauga, 2002), *Pseudomonas* (Yamamoto & Harayama, 1998) *Acinetobacter* (Yamamoto *et al.*, 1999) et *Vibrio* (Le Roux *et al.*, 2004;

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

Venkateswaran *et al.*, 1998). Tout comme le gène de l'ARNr 16S, il semble ne pas être fréquemment transféré horizontalement d'une espèce à l'autre et peut être retrouvé chez presque toutes les espèces bactériennes (Yamamoto & Harayama, 1995; Yamamoto & Harayama, 1998). Il peut être utilisé pour valider l'appartenance à une espèce bactérienne avant l'hybridation ADN-ADN. Néanmoins, l'analyse de la *gyrB* s'est avérée moins discriminante pour les espèces *V. tasmaniensis*, *V. pomeroyi*, *V. kanaloaei* (Thompson *et al.*, 2001). Récemment, les travaux de Garnier *et al.*, (2008) ont montré que l'espèce *V. aestuarianus* formait un groupe phylogénétique très homogène quel que soit le marqueur moléculaire utilisé. En effet, les arbres phylogénétiques construits à partir de la *gyrB* et des séquences de l'ADNr 16S montraient une similarité de 99 % entre les souches de *V. aestuarianus* de même qu'avec les gènes *RecA*, *RopA*, et *ToxR*. Ainsi, partant des résultats du colony-blot et des PCR, nous pouvons admettre sous réserve d'une confirmation par le séquençage d'autres gènes et/ou l'hybridation ADN-ADN, que toutes les souches issues de l'huître ainsi que les souches 07/058, 07/059 et 07/061 sont des souches de l'espèce *V. aestuarianus*.

Afin de caractériser ces différents isolats apparentés à *V. aestuarianus*, nous avons choisi la méthode biochimique par galeries API 20^E ainsi qu'une méthode de mesure de l'activité protéasique. Les caractères phénotypiques sont peu informatifs puisque beaucoup sont négatifs (Garnier *et al.*, 2008). Néanmoins certains caractères positifs sont communs à toutes les souches issues de l'hémolymphe des huîtres même si ces caractères ne sont pas spécifiques de l'espèce *V. aestuarianus*. De fait, nous ne pouvons tirer une conclusion définitive de ces résultats. Les tests biochimiques bien que très versatiles, sont encore utilisés et peuvent renseigner sur les potentialités métaboliques d'une souche dans l'environnement donné. Par ailleurs, nous nous sommes intéressés à l'activité protéasique des surnageants de culture. En effet, il a été démontré que la toxicité des produits extraits cellulaires (ECPs) de certaines souches pathogènes de *V. aestuarianus* était liée à l'activité protéasique de ces ECPs. Par exemple, la souche 01/32, virulente par injection, excrète des ECPs présentant un effet léthal pour l'huître (Labreuche *et al.*, 2008). Par la suite, ils ont caractérisé la métalloprotéase à l'origine de ces effets délétères.

Les résultats des tests d'azocaséine, ont montré une grande variabilité dans les activités protéasiques des différents isolats sans lien entre le milieu d'isolement. Notons aussi, que deux colonies isolées d'une même huître vivante, présentaient des activités protéasiques très différentes. Nous avons donc testé la virulence de ces deux souches par infection expérimentale. Les résultats ont montré que la souche 0115/07 ayant la plus faible activité protéasique induit les plus fortes mortalités. Nous en avons conclu que cette souche devait posséder des facteurs de virulence autres que la métalloprotéase à moins qu'elle ne s'exprime qu'*in vivo*. D'après les expériences précédentes une

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

corrélation apparaissait entre l'activité protéasique et la virulence (Garnier et al, 2008, De Décker, communication personnelle). Le fait de trouver une souche pathogène sans métallo-protéase ouvre la voie à la recherche d'autres facteurs de virulence

III. Circulation de *V. aestuarianus* entre le sédiment, l'eau de mer *C. gigas* : expériences en microcosmes (article 3)

Les études écologiques de *V. aestuarianus* dans l'environnement ont montré que ce *Vibrio* était présent toute l'année dans les sédiments des deux sites ostréicoles étudiés. Nous avons donc conclu que le sédiment pouvait être un réservoir de *V. aestuarianus* à partir duquel ce dernier pourrait passer dans l'eau de mer et est filtré par les huîtres. Les caractérisations phénotypiques et biochimiques ont montré une grande hétérogénéité parmi l'ensemble des isolats. Néanmoins, les premiers essais de typage réalisés à l'aide de la RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) ont montré une homogénéité de profils pour l'ensemble des isolats. L'analyse d'un plus grand nombre d'isolats ainsi que l'utilisation d'une autre méthode de typage plus fine permettra de déterminer s'il existe une spécificité de niche parmi les isolats ou si les isolats du sédiment sont les mêmes que ceux que l'on peut retrouver dans les huîtres. Ces données seront nécessaires pour établir un modèle d'échange de ce *Vibrio* entre le sédiment et les huîtres.

Dans l'étude suivante, nous avons réalisé des expériences en microcosmes afin de vérifier le transfert de *V. aestuarianus* entre le sédiment, l'eau de mer et l'huître.

Les expériences ont été effectuées dans des bacs en plastique de 30 litres contenant, chacun 5 litres de sédiment, 15 litres d'eau mer filtrée et traitée aux U.V. Deux types d'expériences ont été réalisées. Dans la première expérience, nous avons testé la capacité de *V. aestuarianus* à infecter les huîtres à partir du sédiment via l'eau de mer et son passage de l'eau de mer vers le sédiment. Dans la deuxième expérience, nous avons vérifié le rejet de *V. aestuarianus* par les huîtres dans l'eau de mer. Trois conditions ont été réalisées pour la première expérience avec deux réplicats par conditions (Figure 45).

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

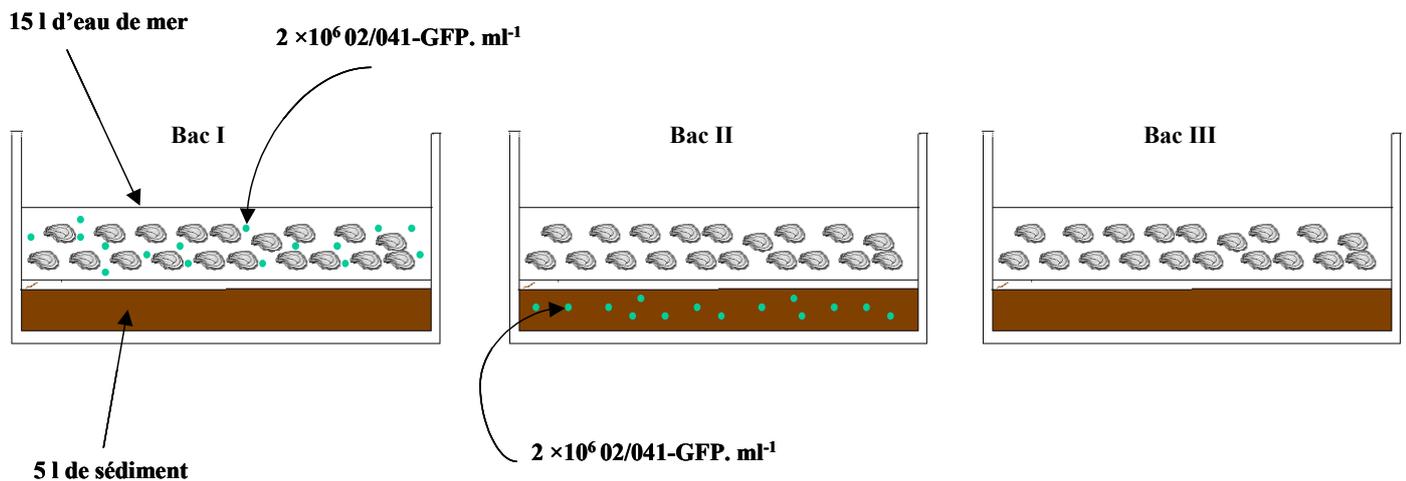


Figure 45 Représentation des expériences en microcosme. Les bacs I ($\times 3$) servent à l'étude du transfert de *V. aestuarianus* de l'eau vers le sédiment, mais aussi vers les huîtres. Dans les bacs II ($\times 3$), la bactérie GFP est ajoutée au sédiment pour étudier le passage vers l'eau de mer. Les bacs III servent de témoins dans lesquels aucune bactérie GFP n'a été ajoutée.

Dans la deuxième expérience, nous avons étudié le relargage de *V. aestuarianus* par les huîtres dans le but de vérifier le rôle potentiel de ces mollusques dans la contamination du milieu. Pour cela, des huîtres ont été préalablement mises dans de l'eau contenant 2×10^6 02/041-GFP. ml⁻¹ et ce pendant 24 h. Par la suite, ces huîtres ont été lavées et rincées avec de l'eau puis remises dans des bacs contenant, 15 litres d'eau de mer stérile et du sédiment (5L), tous les deux n'ayant pas reçu de bactérie GFP.

Le sédiment, l'eau de mer ainsi que la glande digestive et l'hémolymphe de trois huîtres ont été prélevés régulièrement. Des dilutions de ces différents échantillons ont été étalées sur du milieu marine agar et les colonies fluorescentes ont été comptées après 48 heures d'incubation à 20° C.

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

Les résultats de la première expérience ont montré que lorsque l'eau de mer est contaminée, la 02/041-GFP est détectée dans la glande digestive et l'hémolymphe des huîtres ainsi que dans le sédiment. De même, lorsque le sédiment est contaminé, on observe le passage de cette bactérie dans l'eau surnageante et dans la glande digestive ainsi que dans l'hémolymphe des huîtres. Ces deux types de challenge confirment la circulation de la 02/041-GFP entre les trois compartiments. Dans la seconde expérience, nous avons aussi observé, un relargage de *V. aestuarianus*, 02/041-GFP par les huîtres. En effet, cette souche a été détectée dans l'eau de mer et le sédiment après mise en contact avec des huîtres contaminées. Par ailleurs, nous avons aussi constaté que des huîtres non-contaminées peuvent ainsi le devenir par le biais d'autres huîtres contaminées (se référer à l'article 3, expérience 2).

Néanmoins, ces expériences ont aussi montré que cette bactérie ne persiste pas longtemps dans les trois compartiments. L'hypothèse la plus probable est que si elle ne peut s'installer durablement dans les sédiments c'est probablement à cause de la compétition avec des bactéries déjà présentes. Dans l'eau elle est filtrée et détruite par la digestion et le système immunitaire des huîtres. Enfin cette bactérie peut induire des mortalités d'autant plus élevées que sa concentration atteinte dans l'eau est forte.

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

Transfer of *Vibrio aestuarianus* between sediment, seawater and oysters (*Crassostrea gigas*): microcosm experiments using a green fluorescent protein tag (*In prep*).

Afi Azandégbé, Frederique Le Roux, Matthieu Garnier, Marie-José Garet-Delmas, Jean-Louis Nicolas

Ifremer, Laboratoire de physiologie des Invertébrés, PFOM, Centre de Brest

BP70. 29280 Plouzané, France

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

Abstract

Microcosm experiments were conducted to gain insight into the circulation of *Vibrio aestuarianus*, a pathogen of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, between sediment, seawater and oysters. A strain of *V. aestuarianus* was used containing a plasmid (pSW23^T) which carried the *gfp*-gene that encoded a Green Fluorescent Protein (GFP) and also a gene that provided chloramphenicol resistance; each gene facilitated detection of the presence of *V. aestuarianus* on agar plate. Regardless of whether the bacterium was inoculated into seawater, sediment or oysters, it colonised the whole microcosm within 48 hours. It entered the oysters and concentrated in their digestive glands. The penetration and concentration of this strain in the haemolymph and the subsequent mortality rate depended on its initial concentration in the seawater. It multiplied in healthy and diseased oysters, which released it, but it could not establish itself permanently and disappeared progressively. Although the microcosm conditions were not natural, our results showed that *V. aestuarianus* can easily circulate between sediment, seawater and oysters. Sediment may therefore be an environmental source of *V. aestuarianus*. However, further analysis of other tissues could elucidate whether *V. aestuarianus* is completely eliminated by oysters or not.

Key Words: *Vibrio aestuarianus*; Oyster; *Crassostrea gigas*; Haemolymph; Sediment

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

1. Introduction

Summer mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* is a complex syndrome in which different parameters are involved: e.g. the physiological status of the oysters, the environment (temperature, sediment) and the presence of herpes virus (OsHV1) and *Vibrio* spp. (Samain & McCombie, 2008). Sediment risk involves the emission of ammonia and sulphides and the potential role of sediment as a reservoir for pathogenic *Vibrio* spp., such as *V. splendidus* and *V. aestuarianus*. *V. aestuarianus* was first isolated from molluscs and estuarine waters in Oregon and Washington State, USA (Tison & Seidler, 1983a). It has been found also in oyster cultures in Spain (Guisande *et al.*, 2004), while another publication revealed its presence on coasts around the world (Eiler *et al.*, 2006). *V. aestuarianus* was considered a potential pathogen since it was the most abundant infectious bacterium isolated during summer mortality crises in French oyster farming (Garnier *et al.*, 2007). (Labreuche *et al.*, 2006a) conducted studies to gain an understanding of the mechanism of bacterial infection; showing that *V. aestuarianus* killed oysters when pure cultures or its extracellular products were injected. Furthermore, they identified the Vam metalloprotease potentially responsible for its virulence. Recently, *V. aestuarianus* was divided into two subspecies: *V. aestuarianus* subsp. *aestuarianus*, the strain isolated by Tison & Seidler (1983) and *V. aestuarianus* subsp. *francensis*, isolated in France (Garnier *et al.*, 2008). The French strain was distinguished from the Tison & Seidler strain by several phenotypic characteristics and its virulence expression.

Recent studies showed the presence of *V. aestuarianus* in the sediment and oysters of two estuarine areas in France (unpublished data). Although it was present in the sediment year round, it was detected only sporadically in oyster haemolymph. Environmental studies, focussing on the ecology of either the whole *Vibrio* population (Eiler & Bertilsson, 2006; Eiler *et al.*, 2007) or select species, mainly human pathogenic *Vibrio*: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* (Barbieri *et al.*, 1999; Blackwell & Oliver, 2008; Colwell *et al.*, 1981), showed that these bacteria were ubiquitous in

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

estuarine and marine environments. They could be found not only in seawater, molluscs, and fish but also in the sediment (Fukushima & Seki, 2004; Pfeffer *et al.*, 2003). We hypothesized that sediment could represent an environmental habitat from which *V. aestuarianus* could pass into the water and contaminate oysters.

In this study, we conducted microcosm experimental infections using a *gfp*-gene-transformed strain of *V. aestuarianus* and followed the fate of this pathogen in different compartments (seawater, *C. gigas* and sediment) in order to understand where and how it circulated and infected the oysters.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental infection in microcosm

2.1.1 Culture of *V. aestuarianus* strain(02/041) containing the *gfp* -plasmid (hereafter named 02/041-GFP)

The *V. aestuarianus* strain 02/041 was transformed using the pSW23T plasmid according to the method described by Le Roux *et al.*, (Le Roux *et al.*, 2007). The introduced plasmid contained the *gfp*-gene, encoding the Green Fluorescent Protein from the jellyfish *Aequorea victoria*, as well as a gene providing resistance to chloramphenicol. Both markers allowed the path of this bacterium to be followed in the microcosm. Strain 02/041-GFP was cultured at 20°C in marine broth (DIFCO) with chloramphenicol (25µg ml⁻¹) for 24 hours or on marine agar for 48 hours. Bacterial cell concentrations in broth were determined using a cell number:optical density relationship previously established at 540 nm (1 OD = 2 × 10⁹ CFU ml⁻¹).

2.1.2 Oysters, sediment and water

Healthy 2-year-old *C. gigas* were provided by an oyster farm (L'hôpital Camfrout, North Finistere-

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

France). In the laboratory, they were washed to eliminate epifauna and maintained in a natural seawater bath at 15°C with aeration. Two days before the experiment, they were acclimatized to 19°C. Natural seawater was filtered to 5 µm and UV treated. The sediment used during experimental infections was collected from an oyster farm in Aber Benoît, North Finistere.

2.1.3 Experimental design

The microcosm consisted of 40 l tanks containing samples of sediment, oysters and seawater maintained at a constant temperature of 19°C with aeration. During the experiments, the oysters were fed every two days with 200 ml of algal culture mixture (*Isochrysis affinis galbana* and *Chaetoceros calcitrans*) and the water was changed at each sampling date (every 2-3 days).

Experiment 1: Circulation of 02/041-GFP between seawater, sediment and oysters

This experiment was conducted to determine the circulation of *V. aestuarianus* 02/041-GFP between the sediment, seawater and *C. gigas* haemolymph.

Two challenges were carried out. In challenge 1, seawater was inoculated to provide a final concentration of 2×10^6 CFU ml⁻¹ 02/041-GFP. In challenge 2, sediment was inoculated to provide a final concentration of 2×10^6 CFU g⁻¹ 02/041-GFP. Control tanks had no addition of 02/041-GFP. Each treatment was conducted in duplicate. Each tank contained 5 kg of sediment, 60 oysters (separated from the sediment by wire netting) and 15 l of seawater. Sediment (5 g), seawater (5 ml) and oysters (3 per tank) were sampled for quantification of 02/041-GFP 48 hours the first time and after every 3 days. Each day, dying oysters were counted and an aliquot of haemolymph was analysed.

Experiment 2: Release of 02/041-GFP by the oysters into seawater and sediment

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

The second experiment was performed to evaluate the potential contamination of the environment by oysters potentially carrying *V. aestuarianus*. Twenty-five oysters were immersed for 24 hours in 10 l of seawater containing 2×10^6 CFU ml⁻¹ 02/041-GFP. On day 1, they were then placed in 30 l tanks with 5 kg of sediment and 10 l of seawater. On day 5, ten non-infected oysters marked with white scotch-tape were added. On days 5, 8 and 11 the water was renewed. Every three days, 5 g sediment, 5 l seawater and three oysters were sampled for detection and quantification of 02/041-GFP.

2.2. Detection and quantification of 02/041-GFP

Haemolymph of sampled oysters was collected with sterile syringes. The digestive glands were dissected, weighed. 100 mg were homogenized in 1.5 ml tube with 500 µL of sterile seawater and centrifuged at $500 \times g$. The supernatant of digestive gland, haemolymph, seawater and sediment was serially diluted in sterile seawater and plated onto marine agar (Difco) containing 25 µg ml⁻¹ of chloramphenicol. After 48 hours of incubation at 20°C, the fluorescent colonies were counted on a U.V. transilluminator.

3. Results

3.2. Experiment 1 Circulation of 02/041-GFP between seawater, sediment and oysters

Challenge 1: Seawater infection

Concentration of 02/041-GFP in seawater decreased drastically within two days (Fig. 46) and the remaining concentrations represented just 3 % (a decrease of 97 %) of the initial concentration in seawater. Despite the seawater changes, 02/041-GFP was detected in seawater on days 5, 8 and day 11 respectively at concentrations of 5.5×10^3 CFU ml⁻¹, 1.5×10^3 CFU ml⁻¹ and 5×10^2 CFU ml⁻¹. On day 14, no GFP 02/041 was detected in the seawater.

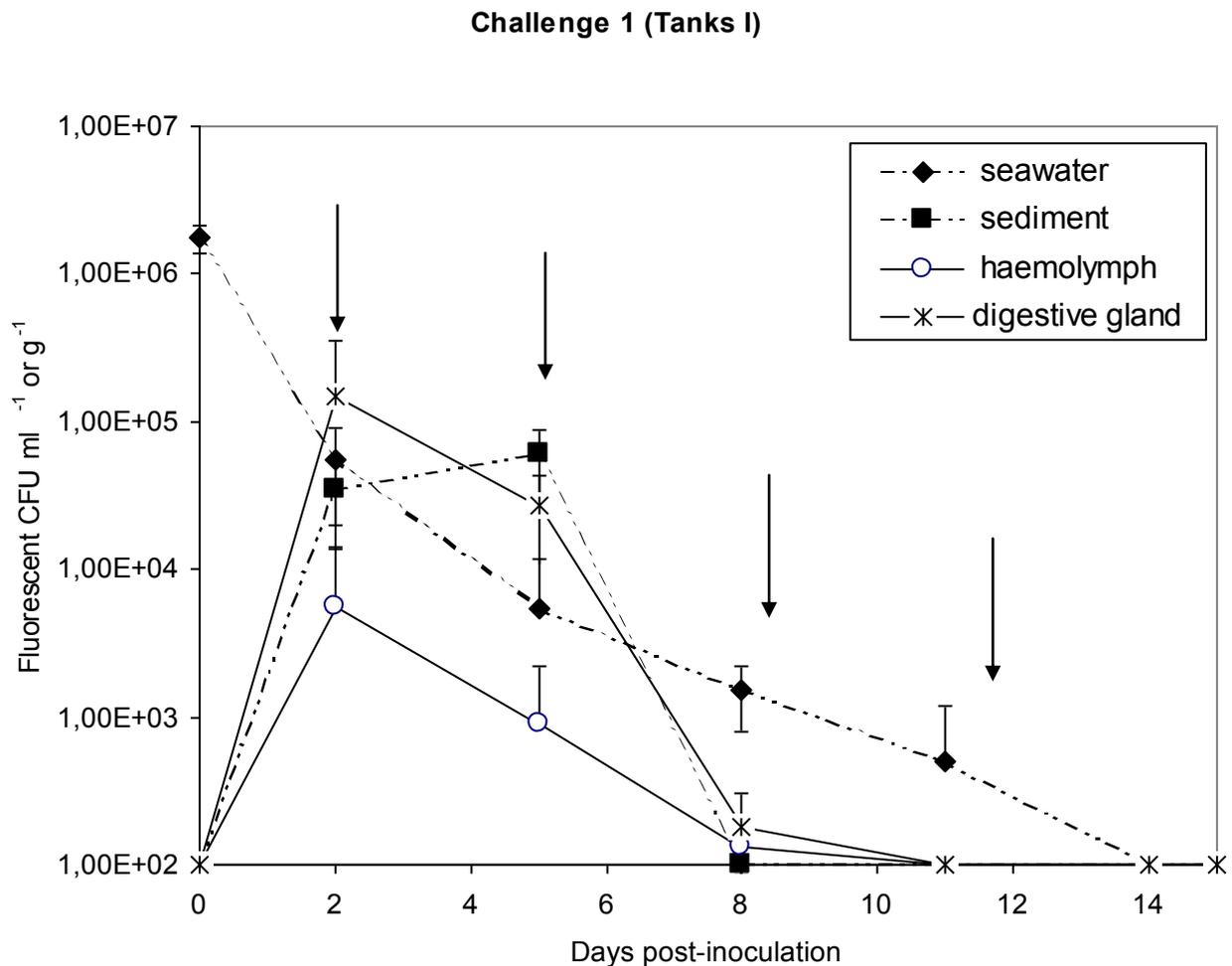


Figure 46 : Experiment 1-challenge 1: Variation in the concentrations of 02/041-GFP in seawater, sediment, digestive gland and the haemolymph of oysters (seawater infected with 2×10^6 CFU ml⁻¹). The values represented in the graphs are means of the concentrations recorded in the tank Ia and Ib on each sampling date. The standard deviations are represented. The arrows indicate the change of the seawater in each tank

During the same trial, 02/041-GFP concentrations in the sediment increased from 0 to 3.5×10^4 CFU g⁻¹ on day 2, representing 2.2 % of the initial quantities in the seawater (Fig.1). These concentrations were maintained until day 5, then decreased below 10^2 CFU ml⁻¹ (the detection limit of the plate dilution method) on day 8. On day 11, no 02/041-GFP was detected in the sediment.

In live oysters, 02/041-GFP was detected in the digestive gland and haemolymph within 48 hours of infection (Fig.1). The counts at this time were 1.5×10^5 CFU g⁻¹ in the digestive gland and 5.5×10^3 CFU ml⁻¹ in the haemolymph. After day 2, the fluorescent counts regularly decreased in the digestive

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

gland and in the haemolymph and they were not detected by day 14.

For the duration of this experimentation, no fluorescent colony was detected in the sediment, the seawater or the oysters of the control tanks of this challenge.

Challenge 2: Sediment infection

Within 48 hours, 02/041-GFP decreased in the sediment from 7×10^5 CFU g⁻¹ to 7.5×10^4 CFU g⁻¹ (a decrease of 90%) (Fig. 47). These concentrations were maintained until day 5, and then decreased about one order of magnitude on day 8 to 6.5×10^3 CFU g⁻¹. This level was maintained at day 11, afterwhich it decreased below the detection limit. During the same trial, 02/041-GFP concentration in seawater was 2.2×10^3 CFU ml⁻¹ on day 2 representing just 0.3 % of the initial quantity of 02/041-GFP in the sediment (Fig.2). These levels were maintained until day 8, afterwhich the concentration fell progressively and 02/041-GFP was not detected at day 15.

In this challenge, in the digestive gland, 02/041-GFP reached 4.6×10^3 CFU ml⁻¹ within 48 hours although it was not yet present in the haemolymph of live oysters (Fig. 2). On day 5, it was detected in the haemolymph at 1×10^3 CFU ml⁻¹. The concentration in digestive gland and in the haemolymph decreased progressively, and by day 11, 02/041-GFP was not detected either in the digestive gland or in the haemolymph until the end of the study (the detection limit being 10^2 CFU ml⁻¹).

In this challenge also, no fluorescent colony was detected in the sediment, the seawater or the oysters of the control tanks.

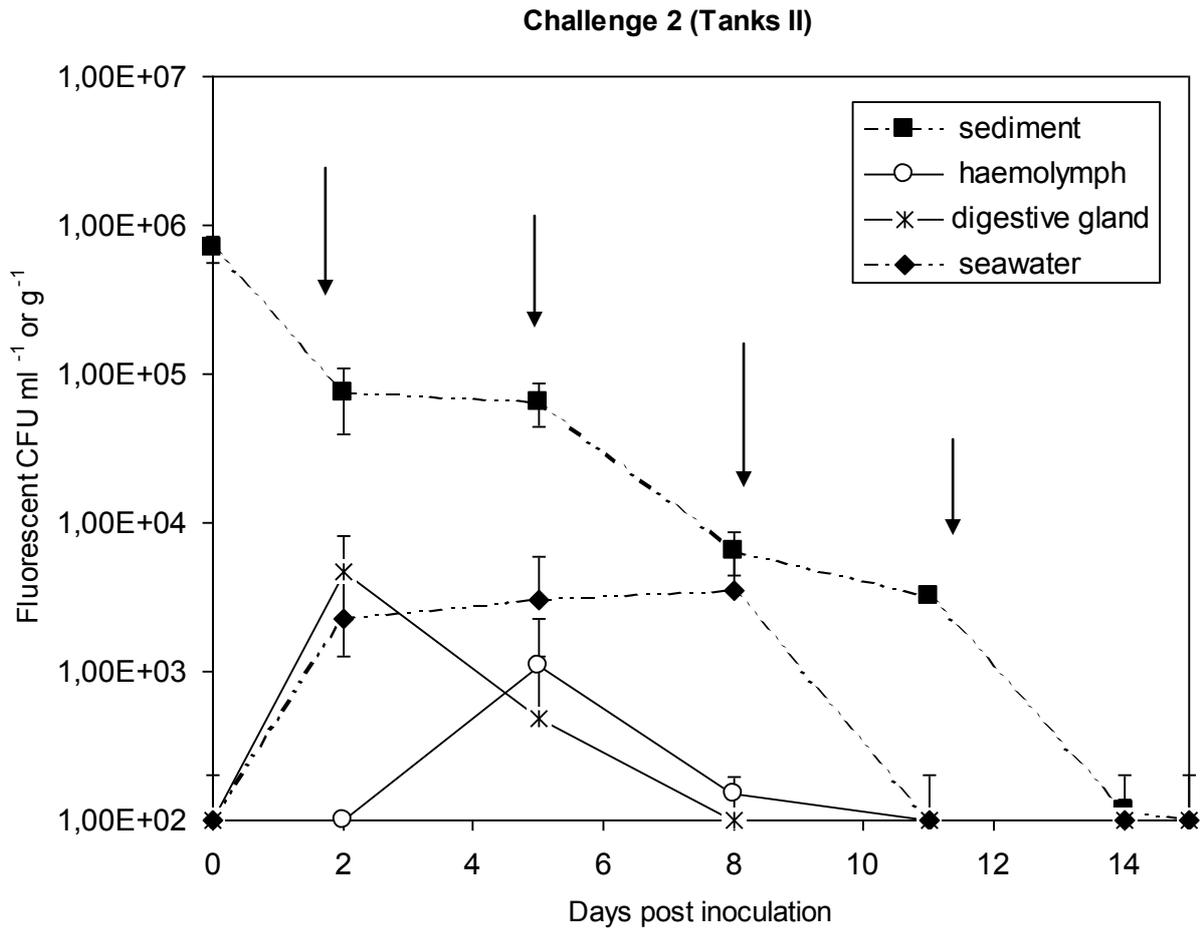


Figure 47 : Experiment 1- Challenge 2: Variation in the concentrations of 02/041-GFP in seawater, sediment, digestive gland and the haemolymph of oysters (sediment infection by 2×10^6 02/041-GFP CFU g⁻¹). The values represented in graphs are means of the concentrations recorded in the tanks IIa and IIb each sampling date. The standard deviations are represented. The arrows indicate the change of the seawater in each tank.

Mortality counts

Mortalities occurred in all tanks throughout the trials and the trends within the 2 challenge treatments were similar (Fig. 48). Most mortalities occurred from day 6 to day 10 in challenge 1 (when seawater was inoculated). The mean cumulative mortality at the end of the trial was 81 % (± 1 %), while in challenge 2 (when the sediment was inoculated) it was 47 % (± 12 %) (Fig. 3). Mortality in the

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

controls was 23.8 % (\pm 4.3 %) by the end of the trial.

In challenges 1 about 100 %, 67%, 75% and 33% of the moribund oysters had septicaemic 02/041-GFP in their haemolymph on days 5, 7, 8 and 9, respectively. The fluorescent counts in the haemolymph of 02/041-GFP moribund oysters on these respective dates were 6×10^8 CFU ml⁻¹, 4.6×10^8 CFU ml⁻¹, 8×10^7 CFU ml⁻¹ and 3.9×10^8 CFU ml⁻¹. Other bacteria were present in the haemolymph of moribund oysters from the control treatment but at lower concentrations, e.g. 7.4×10^3 CFU ml⁻¹ by day 9.

Concerning challenge 2 (where the sediment had been inoculated) 33 %, 75 % and 79 % of the moribund oysters had septicemic 02/041-GFP in their haemolymph on days 6 and 7, day 8 and day 9 respectively. The 02/041-GFP counts in haemolymph of these moribund oysters were about 1.5×10^8 CFU ml⁻¹ by day 9.

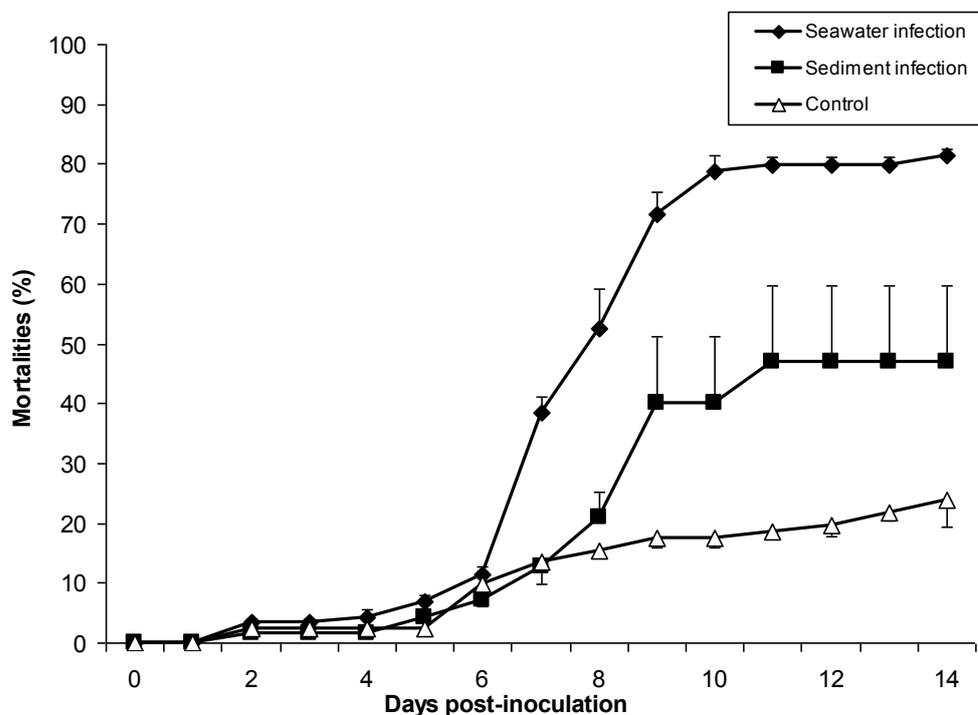


Figure 48 : Means accumulated mortalities in the experiment 1 performed to verify the filtration of 02/041-GFP by *C. gigas*. When seawater was infected or when sediment was infected. In control condition, no 02/041-GFP was added. The values in the profiles are the means of accumulated mortalities, which occurred in two parallel tanks. The error bars are represented

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

3.3 Experiment 2: Release of 02/041-GFP by the oysters into seawater and sediment

02/041-GFP concentrations at the start of the experiment were 2.4×10^4 CFU g⁻¹ in digestive gland and 2.1×10^5 CFU ml⁻¹ in the haemolymph. On day 5, they dropped to 4.7×10^2 CFU g⁻¹ in digestive glands and 4.6×10^2 CFU ml⁻¹ in the haemolymph (Fig. 49). On day 11, 02/041-GFP was detected in the digestive gland and the haemolymph at levels below 10^2 CFU ml⁻¹.

Bacterial counts in seawater and sediment showed that 02/041-GFP concentrations increased for five days up to 4.3×10^4 CFU g⁻¹ in sediment and 2.3×10^4 CFU ml⁻¹ in seawater. Levels then decreased by three orders of magnitude in the sediment and by two orders of magnitude in the seawater on day 8. No 02/041-GFP colonies were detected by day 14 (Fig.4).

On day 5, ten non-contaminated oysters were added to each tank after the seawater had been changed. On day 8, the concentrations of 02/041-GFP recorded in these oysters were 8.5×10^2 CFU g⁻¹ in digestive gland and 5.2×10^2 CFU ml⁻¹ in the haemolymph and they decreased below the detection limit by day 11.

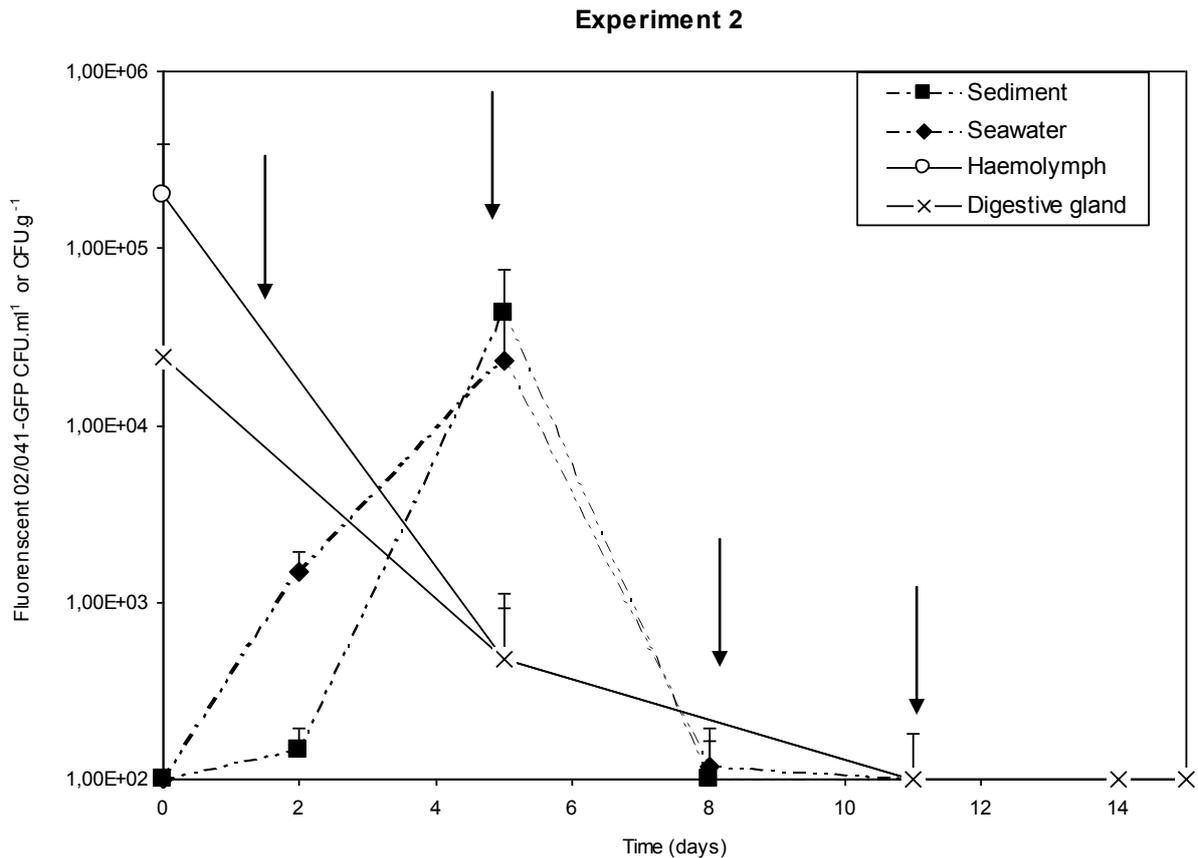


Figure 49 : Experiment 2: Variation in the concentration of fluorescent 02/041-GFP in the seawater, the sediment and alive pre-inoculated oysters. Values represented in the graphs are means concentrations of recorded in the replicates. Errors bars are represented

In this experiment, mortalities were noticed only on days 6 and 7 and were respectively about 8.0 % (± 10.6 %) and 11.8 % (± 3.5 %) respectively. 02/041-GFP concentration in the haemolymph of 98 % of the moribund oysters were 1.6×10^8 CFU ml⁻¹ and 4.7×10^6 CFU ml⁻¹ CFU ml⁻¹ respectively on day 6 and 7.

4. Discussion

In the present work, we conducted two microcosm experiments using a green fluorescent protein tag to study the ability of pathogenic *V. aestuarianus* (strain 02/041-GFP) to circulate between sediment,

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

seawater and oysters. The results showed that a similar evolution occurred in all tanks. This suggested that the observed phenomenon of *V. aestuarianus* ability to transfer within was not random.

Whatever the inoculation route, cultivable *V. aestuarianus* did not accumulate in any compartment and tended to decrease progressively except in moribund oysters. *V. aestuarianus* was able to colonise every microcosm biotope; it rapidly contaminated the sediment from seawater and vice versa. The results demonstrate the ability of *V. aestuarianus* to circulate between sediment, seawater and oysters. A rapid decrease occurred in the seawater or the sediment during the first 48 hours. Despite renewal of seawater, the concentrations remained stable until day 5 in the seawater in challenge 1 and day 8 in challenge 2 suggesting a release from oysters or sediment.

The release from oysters is confirmed by the results of Experiment 2. Oysters previously maintained in seawater with 02/041-GFP had been placed in tanks with sediment and sterile seawater. *V. aestuarianus* was detected in seawater (4.3×10^4 CFU ml⁻¹) and sediment (2.3×10^4 CFU g⁻¹) within 48 hours, while its concentration decreased in the oysters. At this no moribund oysters were present (they had been removed) suggesting release from live oysters.

In the natural environment, bacteria cells bind with particles by strong hydrogen bonds, van der Waals, electrostatic and chemical forces, which promotes bacterial exchanges between sediment and seawater (Randa *et al.*, 2004). Approximately 30-40 % of faecal indication bacteria and about 30% of *Vibrio* populations in seawater are associated with particles (Fries *et al.*, 2006; Hsieh *et al.*, 2004; Krometis *et al.*, 2007). The sediment then represents a source where bacteria are maintained, grow and transfer to seawater by re-suspension. The re-suspension of deposited bacteria is generally promoted by the wind, rainfall or anthropogenic activities (Alm *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006; Mallin *et al.*, 2007). In our work, the frequent water renewals could have induced this re-suspension leading to *V. aestuarianus* decrease in sediment and its increase in seawater and oyster.

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

In Challenge 1, there was a 97 % decrease in the initial levels (10^6 CFU ml⁻¹) inoculated into the seawater. Approximately 2% of this was recovered in the sediment, while levels of 10^5 CFU g⁻¹ digestive gland were detected, suggesting that the oysters filtered the majority of the 02/041-GFP. The same phenomenon was observed in Challenge 2, where only 0.2% of the initial inoculum (sediment) was detected in the water, while high levels were again found in the digestive gland (10^4 CFU g⁻¹). The results confirmed the ability of oysters to filter 02/041-GFP directly from their environment. Some authors suggested that bivalves filter bacteria only when they are attached to suspended particles (LeGall *et al.*, 1997). In this study, we did not test whether 02/041-GFP was attached to particles in seawater or sediment. However, the ability of bivalves to filter bacteria directly from seawater was previously demonstrated by several authors (Daniels *et al.*, 1999; Olafsen *et al.*, 1993). Our results support this assertion, since we detected bacteria in the digestive gland and haemolymph during the first hours of Challenge 1. During this time, there was no water exchange; hence no suspension of sediment, and the water also was pre-filtered of particles. Consequently, bacteria must have entered the animals by active filtration. This is consistent with the results of (Cabello *et al.*, 2005). They used a green fluorescent protein tag to track *V. parahaemolyticus* in oysters, and demonstrated that the oyster *Tiostrea chilensis* was able to filter *V. parahaemolyticus* directly from water. Indeed, when it was inoculated in the microcosm with dead oysters, the concentration of *V. parahaemolyticus*-GFP in the seawater increased by 195 %, while it decreased by 85 % in seawater with live oysters.

Although *V. aestuarianus* 02/041-GFP was able to invade the haemolymph, it did not persist in the animal and its concentration decreased throughout the study. Results of Experience 2 showed that it was partially released. However, it might also be digested in the gut or, destroyed by the immune system of healthy oysters. *Vibrio* spp. are capable of persisting in bivalve tissues (Ciacci *et al.*, 2009; Pruzzo *et al.*, 2005) but scarcely in haemolymph of oysters and their ability to penetrate and establish

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

in haemolymph depended on several factors (Garnier *et al.*, 2008; Olafsen *et al.*, 1993).

Although the oysters were able to eliminate 02/041-GFP, this bacterium persisted for the first few days and induced mortality. The capacity of bacteria to live, proliferate and induce mortality depends on the combined action of the oyster's health status, environmental conditions, bacterial virulence and on the quantity invading (as evidenced by the percentage of cumulative mortality observed in the different challenges). The highest mortalities occurred at the same period in both challenges probably due to the time for infection to develop which lasts four to five days for *V. aestuarianus* (Labreuche *et al.*, 2006a). Twenty percent cumulative mortalities were observed in the control tanks. These residual mortalities were possibly due to the stress induced by the presence of sediment due to presence of ammonia (data not shown). The combined action of this stress and the infection by *V. aestuarianus* probably aided the high mortalities in Challenges 1 and 2.

In conclusion, this work demonstrated that *V. aestuarianus* could easily circulate between sediment, oysters and seawater. It was filtered by oysters, invaded their digestive glands and haemolymph and induced mortality. It rapidly colonized the bottom sediment. The similarity observed between replicates (low errors bars) indicates that the microscop was suitable to model the behaviour of bacteria in environment. Further analysis of others tissues could elucidate whether *V. aestuarianus* is completely eliminated by oysters or not.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Brittany Region and the French Research Institute for Exploitation of the sea (IFREMER). We thank Philippe Miner and Julien Normand for their technical assistance. We are also grateful for Aditya Kesarcodi-Watson for his comments on an early draft.

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

References

- Alm, E. W., Burke, J. & Hagan, E. (2006).** Persistence and potential growth of the fecal indicator bacteria, *Escherichia coli*, in shoreline sand at Lake Huron. *Journal of Great Lakes Research* **32**, 401-405.
- Barbieri, E., Falzano, L., Fiorentini, C. & other authors (1999).** Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic Coast. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2748-2753.
- Blackwell, K. D. & Oliver, J. D. (2008).** The ecology of *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus* in North Carolina estuaries. *J Microbiol* **46**, 146-153.
- Cabello, A. E., Espejo, R. T. & Romero, J. (2005).** Tracing *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Tiostrea chilensis*) using a Green Fluorescent Protein tag. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **327**, 157-166.
- Ciacci, C., Citterio, B., Betti, M., Canonico, B., Roch, P. & Canesi, L. (2009).** Functional differential immune responses of *Mytilus galloprovincialis* to bacterial challenge. *Comp Biochem Physiol B-Biochem Mol Biol* **153**, 365-371.
- Colwell, R. R., Seidler, R. J., Kaper, J. & other authors (1981).** Occurrence of *Vibrio Cholerae* serotype-O1 in Maryland and Louisiana estuaries *Appl Environ Microbiol* **41**, 555-558.
- Daniels, N. A., MacKinnon, L., Bishop, R. & other authors (1999).** *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. In *39th Interdisciplinary Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)*, pp. 1661-1666. San Francisco, California.
- Eiler, A. & Bertilsson, S. (2006).** Detection and quantification of *Vibrio* populations using denaturant gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Methods* **67**, 339-348.
- Eiler, A., Johansson, M. & Bertilsson, S. (2006).** Environmental influences on *Vibrio* populations in northern temperate and boreal coastal waters (Baltic and Skagerrak Seas). *Appl Environ Microbiol* **72**, 6004-6011.
- Eiler, A., Gonzalez-Rey, C., Allen, S. & Bertilsson, S. (2007).** Growth response of *Vibrio cholerae* and other *Vibrio* spp. to cyanobacterial dissolved organic matter and temperature in brackish water. *FEMS Microbiol Ecol* **60**, 411-418.
- Fries, J. S., Characklis, G. W. & Noble, R. T. (2006).** Attachment of fecal indicator bacteria to particles in the Neuse River Estuary, NC. *Journal of Environmental Engineering-Asce* **132**, 1338-1345.
- Fukushima, H. & Seki, R. (2004).** Ecology of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in brackish environments of the Sada River in Shimane Prefecture, Japan. *FEMS Microbiol Ecol* **48**, 221-229.

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

- Garnier, M., Labreuche, Y., Garcia, C., Robert, A. & 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.
- Garnier, M., Labreuche, Y. & Nicolas, J. L. (2008).** Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp *francensis* subsp *nov.*, a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Syst Appl Microbiol* **31**, 358-365.
- Guisande, J. A., Montes, M., Farto, R., Armada, S. P., Perez, M. J. & Nieto, T. P. (2004).** A set of tests for the phenotypic identification of culturable bacteria associated with Galician bivalve mollusc production. *J Shellfish Res* **23**, 599-609.
- Hsieh, J. L., Fries, J. S. & Noble, R. T. (2004).** *Vibrio* and phytoplankton dynamics during the summer of 2004 in a eutrophying estuary. In *Conference on Eutrophication and Pathogen Impacts in New Jersey Coastal Bay*, pp. S102-S109. New Brunswick, NJ: Ecological Soc Amer.
- Krometis, L. A. H., Characklis, G. W., Simmons, O. D., Dilts, M. J., Likirdopulos, C. A. & Sobsey, M. D. (2007).** Intra-storm variability in microbial partitioning and microbial loading rates. *Water Research* **41**, 506-516.
- Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A. & Nicolas, J. L. (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.
- 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. *Appl Environ Microbiol* **73**, 777-784.
- Lee, C. M., Lin, T. Y., Lin, C. C., Kohbodi, G. A., Bhatti, A., Lee, R. & Jay, J. A. (2006).** Persistence of fecal indicator bacteria in Santa Monica Bay beach sediments. *Water Research* **40**, 2593-2602.
- LeGall, S., Hassen, M. B. & LeGall, P. (1997).** Ingestion of a bacterivorous ciliate by the oyster *Crassostrea gigas*: Protozoa as a trophic link between picoplankton and benthic suspension-feeders. *Mar Ecol-Prog Ser* **152**, 301-306.
- Mallin, M. A., Cahoon, L. B., Toothman, B. R., Parsons, D. C., McIver, M. R., Ortwine, M. L. & Harrington, R. N. (2007).** Impacts of a raw sewage spill on water and sediment quality in an urbanized estuary. *Marine Pollution Bulletin* **54**, 81-88.
- Olafsen, J. A., Mikkelsen, H. V., Glaever, H. M. & Hansen, G. H. (1993).** Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marines bivalves at low temperatures *Appl Environ Microbiol* **59**, 1848-1854.
- Pfeffer, C. S., Hite, M. F. & Oliver, J. D. (2003).** Ecology of *Vibrio vulnificus* in estuarine waters of eastern North Carolina. *Appl Environ Microbiol* **69**, 3526-3531.
- Pruzzo, C., Gallo, G. & Canesi, L. (2005).** Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environ Microbiol* **7**, 761-772.

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

Randa, M. A., Polz, M. F. & Lim, E. (2004). Effects of temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* population dynamics as assessed by quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol* **70**, 5469-5476.

Samain, J. F. & McCombie, H. (2008). Summer mortality of pacific oyster *Crassostrea gigas* The Morest project, pp. 379. Edited by Quae.

Tison, D. L. & Seidler, R. J. (1983). *Vibrio aestuarianus* - A new species from estuarine waters and shellfish. *Int J Syst Bacteriol* **33**, 699-702.

Conclusion

Le sédiment en tant que réservoir de *V. aestuarianus*

Afin de comprendre le rôle du sédiment dans le déclenchement des mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, la première partie de ce travail a consisté à étudier son rôle en tant que réservoir de pathogènes de l'huître creuse. Pour ce faire, nous avons entrepris l'étude de l'écologie de *V. aestuarianus* à travers un suivi de son abondance dans le sédiment et l'hémolymphe des huîtres. Les échantillonnages de sédiment et d'huîtres ont été effectués du mois de juin 2007 au

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

mois de septembre 2007, puis en février, mars, mai et juin 2008 sur deux sites ostréicoles situés l'un en aval de la Rivière d'Auray et l'autre en aval de l'Aber benoît. Les résultats des dénombrements réalisés par la méthode du colony-blot, ont montré d'une part que *V. aestuarianus* était présent dans les sédiments et l'hémolymphe des huîtres des deux sites ostréicoles et d'autre part, une variabilité saisonnière de son abondance dans ces deux milieux.

Isolée au départ dans les eaux saumâtres et dans les mollusques sur la côte ouest des Etats-Unis, *V. aestuarianus* n'était pas considéré comme pathogène jusqu'aux phénomènes de mortalités estivales de l'huître creuse *C. gigas*. Bien que les auteurs aient indiqué une association très étroite entre ce *Vibrio* et les populations bactérienne des mollusques, il manquait des données sur ses habitats et sur son abondance dans l'environnement. Les données bibliographiques ont montré une relation étroite entre les espèces de *Vibrio* en général et les mollusques bivalves. Dans cette étude, les analyses de l'hémolymphe de *C. gigas* ont montré que *V. aestuarianus* pouvait être présent en de fortes concentrations dans l'hémolymphe des huîtres sans pour autant occasionner des mortalités. En effet dans notre investigation, suivant les périodes de fortes concentrations bactériennes dans les huîtres, il n'a pas été détecté de fortes mortalités comme attendues. Par ailleurs, les analyses ont aussi montré que la présence de *V. aestuarianus* dans l'hémolymphe des huîtres n'était pas systématique. ainsi ce *Vibrio* n'a pas été détecté ni dans le sédiment ni dans l'hémolymphe des huîtres pendant la saison froide en février et en mars 2008. Bien qu'il fût possible de le détecter dans le sédiment à partir du mois de mai avec la hausse de la température de l'eau, il n'était pas réapparu dans les hémolymphe des huîtres analysées (60 huîtres par date). Finalement *V. aestuarianus* semble bien présent toute l'année dans les sédiments des sites ostréicoles. Sa présence dans les huîtres dépendrait des conditions environnementales comme la remise en suspension du sédiment dans l'eau surnageant, mais aussi de l'état physiologique et immunologique de l'huître.

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

Les différentes expérimentations en microcosme réalisées dans ce chapitre, ont permis de vérifier qu'un échange de *V. aestuarianus* pouvait s'opérer entre le sédiment et l'eau de mer. *V. aestuarianus* colonisait rapidement les différents compartiments et sa concentration tend à s'équilibrer entre eux. Les analyses ont montré que le relargage de ce *Vibrio* par les huîtres alimente l'eau de mer mais que cette bactérie ne peut résider pas longtemps à l'état libre dans la colonne d'eau. Elle est soit filtrée de nouveau soit se dépose et pénètre dans le sédiment sous-jacent, où elle peut résider et alimenter à nouveau l'eau de mer par remise en suspension sous l'action de divers facteurs, dont sa propre mobilité et les mouvements de l'eau.

Cependant il y a un écart entre le comportement de *V. aestuarianus* en microcosme et dans l'environnement. Dans ce dernier *V. aestuarianus* semble persister beaucoup plus longtemps à la fois dans le sédiment et dans les huîtres sans d'ailleurs entraîner de mortalités. Sans doute les huîtres devaient être dans un meilleur état physiologique que dans le microcosme. Dans le sédiment il aurait été intéressant de savoir à quel niveau du sédiment il résidait, est-ce en surface avec les biodépôts ou en profondeur ? ce qui va être prochainement vérifié en faisant une stratification des carottes du sédiment. Par ailleurs dans l'environnement nous n'avons pas pu examiner sa présence dans la colonne d'eau mais très probablement ses concentrations n'atteignent pas les mêmes niveaux que ceux observés dans l'hémolymphe des huîtres en poche (jusqu'à 10^5 par ml). Il pourrait être aussi être hébergé, se multiplier et véhiculer par le zooplancton comme pour d'autres espèces du genre *Vibrio* (Cf. données bibliographiques : Les bactéries du genre *Vibrio*) Ainsi dans la nature il semble qu'il y ait un tropisme fort de *V. aestuarianus* pour son hôte. En microcosme il aurait fallu comparer la colonisation de *V. aestuarianus* de l'huître avec celle de bactéries non pathogènes pour vérifier cette hypothèse.

La caractérisation d'une espèce bactérienne dans un environnement donné passe par son isolement préalable à partir d'un milieu de culture. Malheureusement, nous n'avons pu isoler que 21 souches identifiées comme appartenant à l'espèce *V. aestuarianus* dont 3 du sédiment. Les

Chapitre 3 : Le sédiment, réservoir de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de l'écologie de *Vibrio aestuarianus*

caractérisations préliminaires de ces souches ont permis de confirmer d'abord l'hétérogénéité phénotypique observée auparavant par Labreuche (2006) et par Garnier et al (2008) chez les souches de *V. aestuarianus*. Par ailleurs, deux souches, 07/115 et 07/116 isolées de la même huître ont montré des activités protéasiques différentes. Toutes les deux souches sont virulentes car elles induisent plus de 50 % de mortalités chez les huîtres injectées. Néanmoins, la souche 07/115 qui a la plus faible activité protéasique, induit le plus fort taux de mortalité. Ce dernier aspect suppose donc que l'expression de la virulence d'une souche de *V. aestuarianus* n'est pas systématiquement liée à l'activité protéasique des surnageants de culture.

Au vu de ces résultats, plusieurs questions demeurent, à savoir, les portes d'entrée de *V. aestuarianus* dans l'hémolymphe des huîtres, l'entrée en l'état VBNC de *V. aestuarianus*, sa fixation aux copépodes. Néanmoins, ces résultats constituent des prémices dans l'étude de l'écologie de ce vibriion et d'autres *Vibrio* pathogènes d'invertébrés marins. Ainsi, *V. aestuarianus* pourrait avoir des niches écologiques beaucoup plus diversifiées que son seul lien avec les mollusques et le sédiment.

Troisième Partie

Discussion générale & perspectives

Discussion générale et perspectives

La problématique de ce travail se situe dans la continuité du déficit « Morest ». Les analyses réalisées dans le cadre de ce défi avaient conduit à proposer une origine multifactorielle aux mortalités. Les facteurs environnementaux tels que les ressources trophiques, la température et le sédiment affaiblissent d'une façon directe ou indirecte les huîtres qui deviennent moins résistantes aux pathogènes en période de maturation et selon leur base génétique. Les pathogènes les plus souvent détectés en dehors de l'herpès appartiennent au genre *Vibrio* avec comme espèces principales *V. splendidus* et *V. aestuarianus*. Cette dernière avait la plus forte occurrence dans les échantillons analysés les premières années. Sa pathogénicité étant prouvée, il devenait alors logique d'étudier son écologie afin de prendre d'éventuelles mesures de protection. Aucune espèce du genre *Vibrio*, pathogène d'invertébrés marins, n'avait jusque-là fait l'objet d'études écologiques. Cette bactérie avait été détectée dans les de différents sites ostréicoles de France d'après une étude préliminaire. Les données bibliographiques disponibles sur les espèces du genre *Vibrio*, mettent en exergue outre leur ubiquité dans les zones côtières, leur capacité à adhérer aux surfaces des organismes planctoniques qui leur permet de résister aux conditions défavorables (température, salinité ou pH non adaptés, baisse de la disponibilité en nutriments) par l'utilisation des composés organiques présents à la surface de ces organismes (chitine). La sédimentation de ce plancton une fois mort ainsi que leur capacité à entrer dans l'état viable non cultivable (VBNC) leur permettent de s'établir dans le sédiment et de résister également aux conditions défavorables. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que le sédiment servirait de réservoir de pathogènes de l'huître creuse comme *V. aestuarianus*.

Par ailleurs, le sédiment était considéré comme source de composés toxiques. En effet, les analyses de Morest ont montré qu'il existait une concomitance entre l'augmentation des substances potentiellement toxiques (ammonium et sulfures) issues de la dégradation de la matière organique dans le sédiment et l'apparition des mortalités.

Ce travail de recherche se décline par conséquent selon trois études principales :

- 1- l'étude des caractéristiques physico-chimiques des sédiments dans deux environnements contrastés dans lesquels évoluent les huîtres en évaluant l'impact de la culture de ces dernières sur ces paramètres et le risque qu'il génère dans les mortalités estivales de *C. gigas*
- 2- l'étude de la structure des communautés bactériennes des sédiments des sites ostréicoles étudiés en considérant l'impact de la présence des huîtres sur celles-ci, les relations entre leur structure et certains paramètres du sédiment

3- l'étude de l'écologie de *V. aestuarianus* pathogènes de *C. gigas* en évaluant le rôle du sédiment en tant que réservoir de pathogènes.

Les caractéristiques physico-chimiques des sédiments

Les différences observées dans cette étude concernent les concentrations de carbone, d'azote de phosphate organiques et les concentrations des composés inorganiques issus de la dégradation de la matière organique. Ces différences se situent à trois niveaux à savoir, année 2007 versus année 2008 (pour une même station, sous tables par exemple), sous tables versus hors tables et aber Benoît versus rivière d'Auray.

Les différences entre les deux années sont probablement liées à la pluviométrie et par conséquent à la quantité de ressources trophiques. L'augmentation des concentrations de composés organiques observés en 2008 ferait suite aux blooms phytoplanctoniques et aux apports terrigènes liées à la pluviométrie (les mois d'échantillonnage de l'année 2007 ayant été relativement moins pluvieux que ceux de l'année 2008). Cependant, les rapports C/N obtenus en 2008 (~ 7 pour l'aber Benoît et ~ 6 pour la rivière d'Auray) suggèrent que la matière organique est d'origine marine. En effet le plancton marin a un C/N proche de 7 tandis que les macromolécules telles que la cellulose, la lignine ou la cutine peuvent être présent dans la matière organique d'origine terrigène lui conférant un C/N élevé (20 – 500) (Hedges *et al.*, 1997). L'augmentation des concentrations peut être aussi due aux biodépôts provenant des huîtres qui consomment le plancton. La concentration de chlorophylle *a* est aussi élevée pour l'année 2008 surtout dans l'aber Benoît avec un profil identique à celle des composés organiques. Des études ont montré que la qualité et la quantité saisonnières de biodépôts étaient dépendantes de la concentration de chlorophylle *a* et de seston. L'effet de la sédimentation de ces biodépôts va alors dépendre de plusieurs paramètres dont l'hydrodynamisme (Grant *et al.*, 1995) qui varie selon la zone, et de la capacité de minéralisation des communautés bactérienne et macrobenthique (Barranguet *et al.*, 1994; Baudinet *et al.*, 1990; Grant *et al.*, 1995; Mattsson & Linden, 1983).

L'effet de la présence des tables ostréicoles est plus évident dans l'aber Benoît. En effet, les concentrations du carbone, d'azote et de phosphate organiques sont en moyenne plus fortes sous les tables d'un facteur 1,2 à 1,5. Les concentrations d'ammonium, de phosphate et de sulfures issus de la dégradation de la matière organique atteignent des valeurs beaucoup plus élevées de l'ordre d'un facteur 10 au moins sous table en 2008 suggérant une dégradation de la matière organique plus intense à ce niveau. En revanche en rivière d'Auray les concentrations de la matière organique et des composés issus de sa dégradation sont quelques fois plus fortes hors tables mais en général elles sont identiques entre les sédiments sous tables et hors tables. L'apport du bassin versant et la présence de

macroalgues sur le sédiment hors tables sur ce site masqueraient globalement l'effet de la présence des huîtres que l'on observe dans l'aber Benoît. Le sédiment du site de la rivière d'Auray est plus riche en matière organique. Cependant, les concentrations d'ammonium, de phosphate et de sulfures y sont plus faibles qu'à l'aber Benoît, suggérant une activité bactérienne de dégradation plus faible sans doute en relation avec le type de matière organique mais aussi les groupes bactériens présents dans les communautés bactériennes. Il semble bien que ces biodépôts provenant des huîtres soient rapidement dégradés par les bactéries et ne viennent que marginalement augmenter le taux de matière organique des sédiments. Les effets de la culture des bivalves ou des biodépôts sur l'environnement varient selon les études. Dans la majorité des études, l'accumulation de la matière organique provenant des fèces et des pseudofèces des bivalves induit des changements dans les caractéristiques physique, chimique et biologique dans les écosystèmes touchés et ces changements sont plus évidents dans les sédiments (Mirto *et al.*, 2000; Vinther *et al.*, 2008). Certaines études ont montré que la présence que la matière organique est 6 fois supérieure dans les sédiments avec *C. gigas* que dans les sédiments sans *C. gigas* (Feuillet Girard *et al.*, 1994). Pour des zones de culture de moules, les concentrations sont de 2,3 à 3 fois supérieures (Grant *et al.*, 1995). D'autres études n'observent aucun effet (Crawford *et al.*, 2003). Cependant, il a été démontré que l'enrichissement en matière organique des sédiments n'est pas reflété par les concentrations en carbone et en azote organique mais plutôt par le degré de sédimentation (Dahlback & Gunnarsson, 1981; Grant *et al.*, 1995). Pour (Mitchell, 2006), les flux tidaux peuvent disperser la matière organique générant ainsi un effet moindre dans les estuaires. Cependant les concentrations d'ammonium et de sulfures des sédiments des sites suggèrent que la dispersion est insuffisante pour éviter le dépôt de la matière organique.

Pour prolonger cette étude, la sédimentation des biodépôts sur le fond pourrait être estimée en piégeant les particules sous et hors table et être ainsi reliée à la concentration en matière organique du sédiment et aux espèces chimiques résultant de sa dégradation. Par ailleurs, la composition de la matière organique des sédiments de chaque site devrait être étudiée afin de connaître leur origine (majoritairement terrigène ou marine). L'étude de la composition des biodépôts confirmerait ou non l'hypothèse d'une plus grande dégradabilité.

Etudes des communautés bactériennes des sédiments

Cette étude avait pour objectif d'étudier la structure des communautés bactériennes des sédiments et de déterminer l'influence de la présence des huîtres pour deux raisons. La première parce que les bactéries interviennent dans les processus biogéochimiques. Un apport plus élevé de matière organique sous les tables devrait influencer leur structure. La seconde parce que les

Discussion générale et perspectives

biodépôts provenant des huîtres peuvent contenir des bactéries telles que les *Vibrio* (Prieur, 1981). Ainsi ces sédiments peuvent contenir d'éventuels pathogènes qui pourraient réensemencer l'eau et atteindre les huîtres.

Les bactéries cultivables sur Marine Agar (MA) reflètent des fluctuations de la flore bactérienne au cours des saisons sans pour autant révéler des différences entre les stations d'un même site (sous tables versus hors tables). En réalité, le nombre de bactéries capables de former des colonies visibles sur ce type de milieu de culture ne représente que 0,1 à 0,2 % de la fraction obtenue par comptage direct (Bianchi & Giuliano, 1996). Par des comptages directs effectués au mois de juin 2009 dans le sédiment de l'aber Benoît, les concentrations bactériennes dépassent 10^9 /g de sédiment humide pour au maximum 10^7 /g de cultivables. Pour expliquer cet écart une proportion importante des cellules bactériennes doit être non cultivable ou exclues de nos conditions de culture (bactéries anérobies strictes, bactéries liées aux particules...). Une étude a montré que la densité bactérienne augmente avec la quantité de matière organique (Findlay *et al.*, 1995). En utilisant la méthode culturale, des études réalisées dans des fermes piscicoles ont montré que les concentrations de la flore bactérienne cultivable ainsi que les concentrations des *Vibrio* sur TCBS étaient plus fortes sous les cages de poissons que dans les sédiments des sites de référence moins riches en matière organique (Castine *et al.*, 2009; Vezzulli *et al.*, 2002). Néanmoins d'autres auteurs comme (Danovaro *et al.*, 2004) n'ont pas observé d'impact des bivalves sur les populations bactériennes dénombrées en comptage direct.

Les résultats obtenus dans notre cas pourraient être dus à la faible distance séparant les sites sous tables et hors tables, à la présence d'autres sources de matière organique (rivière d'Auray). Dans l'aber Benoît, il est plus probable que l'apport de la matière organique impacte plus le métabolisme des bactéries que leur densité. En effet, lorsque les bactéries sont attachées aux particules, elles privilégient la voie métabolique à la production de biomasse tandis que les bactéries libres ou planctoniques favorisent la production de biomasse (Daniel Delmas communication personnelle). Par ailleurs, les comptages ont été effectués sur des mélanges de sédiments de 5 cm. Or, des comptages récents effectués sur différentes tranches de sédiment de l'aber Benoît ont montré que les concentrations de vibrions dans la tranche 1-2 cm de sédiments prélevés sous table étaient 50 fois plus fortes que dans la même tranche pour les sédiments hors table. Par contre en comptage direct le ratio le plus important n'excédait pas 1,4. Un certain nombre d'améliorations pourraient donc être apportées à ces comptages pour mieux mettre en évidence les différences comme cibler des tranches particulières de sédiment (parties oxygène et anoxique), incubé en anaérobiose ou compter sous microscopie à épifluorescence les bactéries en division.

Discussion générale et perspectives

Les variations des communautés bactériennes étudiées par DGGE ont montré des résultats différents selon le site. La DGGE ne fournit pas d'informations quant à la diversité bactérienne totale des sédiments des deux sites d'étude, mais elle a permis de déceler des différences dans la structure des communautés bactériennes dominantes. Sans prendre en compte les limites de la méthode statistique, cette étude a montré une homogénéité spatiale et une dynamique des communautés bactériennes liée aux caractéristiques biogéochimiques. En effet, l'analyse visuelle ainsi que les valeurs des stress de représentations MDS, les profils des communautés bactériennes sous tables se distinguent de ceux hors tables sur les deux sites aber Benoît et rivière d'Auray. Néanmoins cette différence se situe surtout au niveau de l'intensité des bandes plutôt qu'au niveau de la présence ou absence, les sédiments sous tables et hors tables partageant plusieurs bandes. Ainsi la présence des tables d'huîtres a un impact sur quelques membres dont l'intensité des bandes varie en fonction de des dates et par conséquent des conditions du milieu. La température plus les flux de nitrates et de phosphate expliquent en partie cette variabilité. Néanmoins, seuls quatre paramètres ont été intégrés dans les analyses de même que les flux des composés inorganiques plutôt que leurs concentrations réelles ont été considérées. Par ailleurs, si les flux peuvent avoir un impact sur les macroorganismes comme les foraminifères, une relation avec la population bactérienne est moins probable.

Plusieurs études ont montré l'impact des apports de la matière organique sur la diversité bactérienne des sédiments. Dans cette étude, l'impact des tables d'huîtres n'est pas le même pour les deux sites suggérant, des communautés bactériennes ainsi que des conditions environnementales différentes. En faisant abstraction des analyses statistiques, les profils DGGE de l'année 2007 diffèrent de ceux de l'année 2008 en rivière d'Auray. Dans l'aber Benoît, cette différence est moins nette. Ceci suggère que la communauté bactérienne des sédiments de l'aber Benoît est plus stable et diversifiée. Les populations présentes dans les sédiments des deux sites sont communes au milieu marin. Cependant les espèces identifiées sont distinctes entre les sites et comme un grand nombre de bandes semblent stable au cours des saisons et entre les deux stations elles semblent être caractéristiques du site. Toutefois à ce niveau d'analyse elles ne renseignent pas sur les aspects fonctionnels ; en effet, la composition de la communauté n'est pas reliée aux fonctions du milieu (Langenheder *et al.*, 2006).

Pour suivre les bactéries métaboliquement actives qui devraient être plus réactives aux apports de matière organique des amplifications à partir des ARN ribosomiaux (après une RT-PCR) aurait été un meilleur choix mais la technique n'était pas encore maîtrisée au laboratoire. Les fortes concentrations des composés inorganiques observées sous tables dans l'aber Benoît suggèrent un impact sur les métabolismes bactériens. Ainsi, l'étude pourrait être faite en ciblant spécifiquement

Discussion générale et perspectives

des groupes fonctionnels tels que les Anammox, les nitrifiantes, les sulfato-réductrices (Leloup *et al.*, 2009) ou en étudiant les activités bactériennes dans les sédiments.

Cette étude a aussi permis de montrer une faible diversité des *Vibrio* par rapport aux données de la littérature. Néanmoins, rappelons que la méthode utilisée ne cible que les populations dominantes d'un écosystème. La faible représentativité des *Vibrio* suggère que ces derniers constituent une part négligeable de la flore bactérienne totale des sédiments des deux sites. Toutefois, les espèces telles que *V. ordalii* ou *V. anguillarum* et *V. aestuarianus* ont été détectée parmi la flore totale.

Etude de l'écologie de *V. aestuarianus*

Nous avons déterminé l'abondance de ce vibrion dans les sédiments ainsi que dans l'hémolymphe des huîtres. Les concentrations de *V. aestuarianus*, ne diffèrent pas significativement entre les stations. Son abondance varie au cours du temps et est fonction de la température. *V. aestuarianus* était présent dans les sédiments sur toute la durée de l'étude mais il n'était pas cultivable pendant les mois les plus froids. Dans l'hémolymphe des huîtres il apparaissait de Juin à septembre en 2007 mais absent en 2008 en hiver comme en été. L'hypothèse que le sédiment pourrait constituer un réservoir de cette bactérie semble se confirmer. Des transferts entre le sédiment et les huîtres doivent s'opérer même si les bactéries du sédiment forment des assemblages particuliers et si les souches de *V. aestuarianus* pour l'instant identifiées ont quelques caractéristiques morphologiques (colonies plus petites) qui les éloignent des souches pathogènes. Ces transferts peuvent être directs par une remise en suspension du sédiment et une sédimentation de biodépôts contenant ce vibrion ou indirects par des hôtes secondaires comme les copépodes (zooplancton). Le transfert de *V. aestuarianus* du sédiment dans l'eau de mer et sa filtration par les huîtres ont été vérifiés par des expérimentations en microcosmes. Ces résultats ainsi que les données bibliographiques nous permettent de proposer un schéma du cycle de *V. aestuarianus* dans l'environnement (Figure 50).

Discussion générale et perspectives

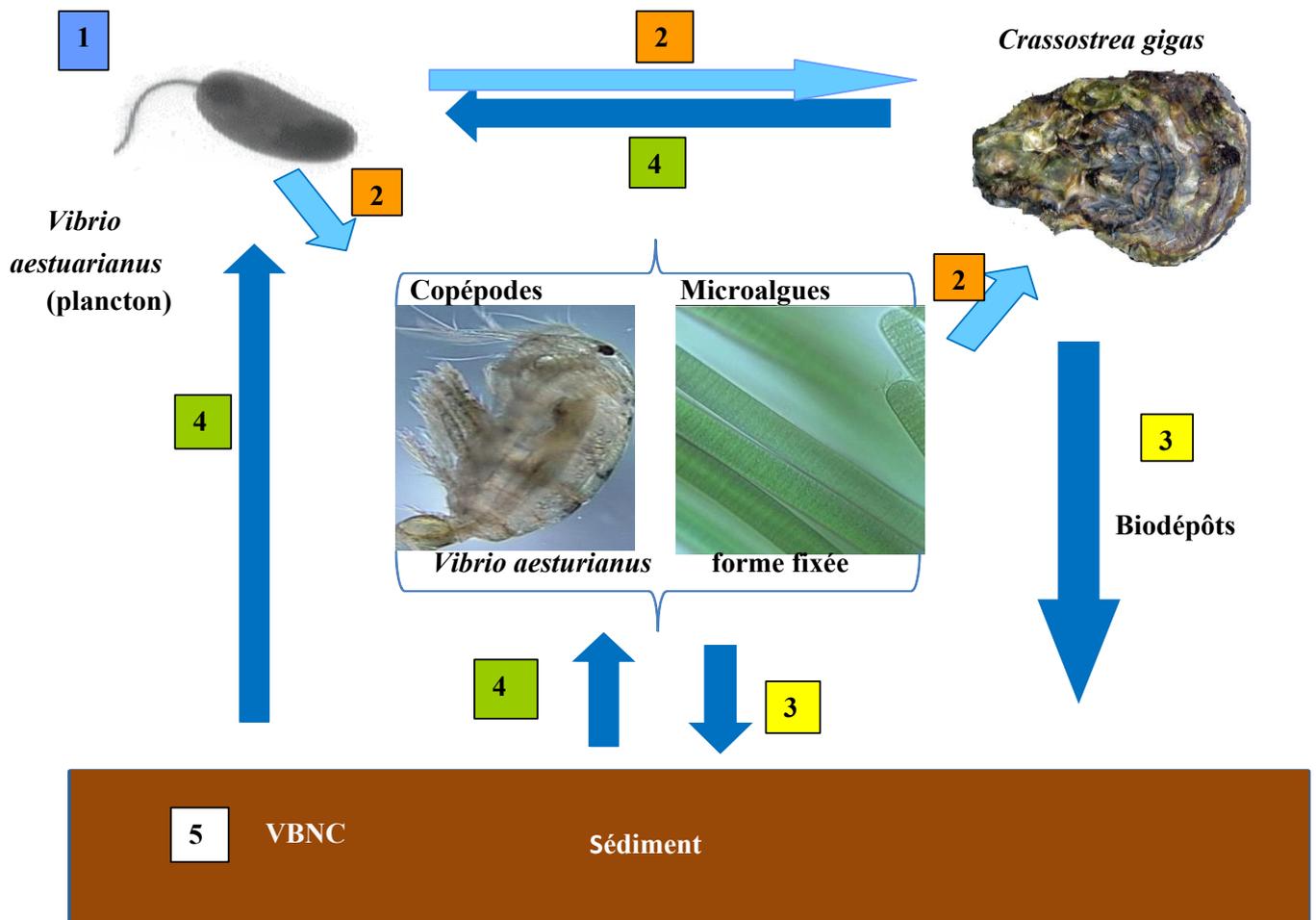


Figure 50 : Représentation schématique du cycle vital de *Vibrio. aestuarianus* pathogène de l'huître creuse *Crassostrea gigas*

La forme planctonique de *V. aestuarianus*, constitue le point de départ du cycle (1). A partir de cette forme planctonique *V. aestuarianus* va se fixer aux particules en suspension (zoo et phyto planctons) et être filtré par les huîtres (2). Après une phase de multiplication sur le zooplancton ou dans les huîtres il va se déposer pour une part sur le sédiment inclus dans les biodépôts ou dans le zooplancton mort et y séjourner (3). Il peut à nouveau coloniser les étages supérieurs par remise en suspension du sédiment (4). Il peut y séjourner pendant une plus longue période lorsque les conditions sont défavorables sous la forme VBNC (5) avant de recoloniser les étages supérieurs lorsque les conditions redeviennent favorables.

Au terme de cette étude, différents travaux peuvent être proposés concernant l'amélioration des connaissances quant à l'écologie de *V. aestuarianus*. Nous savons qu'il fait partie des espèces

Discussion générale et perspectives

dominantes des sédiments des deux écosystèmes étudiés. Néanmoins nous n'avons pas pris en compte l'eau de mer dans notre étude. Dès lors, des études intégrant l'eau de mer ainsi que d'autres paramètres tels que les copépodes, le phytoplancton et la faune benthique permettront d'approfondir des connaissances sur ses différentes niches écologiques et ainsi de valider ce schéma.

De plus, la détection de *V. aestuarianus* par PCR pendant la saison froide alors qu'aucune colonie de cette bactérie n'a été détectée sur milieu de culture suggère son entrée en état VBNC. Ainsi, des études sont envisagées afin de déterminer les facteurs (température, salinité, excès ou manque de nutriments) qui induisent son entrée en VBNC.

La méthode de colony-blot utilisée dans cette étude n'a pas permis de récupérer un nombre suffisant d'isolats permettant de conclure sur l'échange de *V. aestuarianus* entre les huîtres et le sédiment. Néanmoins, des études préliminaires ont été réalisées utilisant la RAPD et ont montré une homogénéité de profils pour les trois souches du sédiment. Les souches de l'huître quant à elles affichent trois types de profils, le profil des souches du sédiment inclus. En outre, nous avons montré par PCR que le gène *Vam* (métalloprotéase de *V. aestuarianus*) était absent chez les trois souches du sédiment. Ces souches seraient *a priori* non pathogènes et différentes de celles présentes spécifiquement dans l'huître ou dans d'autres niches. Des infections expérimentales par injection de culture et des ECP de ces souches à des huîtres sont prévues pour vérifier leur virulence. Les prochaines études intégrant d'autres biotopes en plus du sédiment devraient servir à comprendre l'échange de cette bactérie entre les différents biotopes. Pour cela, les techniques de comptage et d'isolement doivent être améliorées. Ainsi, la mise au point d'une PCR quantitative spécifique de *V. aestuarianus* est programmée pour suivre les variations réelles de cette bactérie dans l'environnement.

L'ensemble du travail de cette thèse a permis de montrer la nécessité d'une étude combinant des paramètres physiques, chimiques et biologiques dans l'étude des relations entre les pratiques ostréicoles et les caractéristiques du milieu. Ce travail a confirmé l'existence d'un risque sédimentaire montré par la présence de forts flux de composés toxiques dans les sédiments à certaines périodes de l'année vis-à-vis des huîtres ou d'autres organismes vivant à proximité ainsi que l'influence des huîtres sur leur intensité. Il a mis en évidence une certaine stabilité de la structure et de la diversité des microflores des sédiments au regard des nombreuses influences qu'elles subissent et la possibilité d'un réservoir de *V. aestuarianus*. Toutefois, les *Vibrio* ne semblent pas être dominants dans ces sédiments. En l'occurrence, *V. splendidus*, un autre vibriion pathogène de l'huître est quasiment absent de cette étude bien que nous ne l'ayons pas ciblé spécifiquement.

Malgré ces risques, les huîtres n'ont pas subi de mortalités très significatives (au maximum 15% sur un mois). Elles avaient cependant atteint une taille et un âge auxquels leur sensibilité aux

Discussion générale et perspectives

pathogènes s'atténue voir disparaît. Néanmoins elles étaient porteuses de grandes quantités de bactéries dont *V. aestuarianus* pendant l'été 2007 indiquant leur affaiblissement.

D'un point de vue épidémiologique si les huîtres, comme porteurs sains notamment, maintiennent *V. aestuarianus* dans l'environnement elles ne semblent pas influencer sur son occurrence dans le sédiment. *V. aestuarianus* apparaît être à l'état endémique avec une répartition très étendue dans les zones côtières. Une comparaison serait à faire avec *V. splendidus* et l'herpès virus. Puisqu'il est admis que ce virus est la cause principale des mortalités depuis 2008, connaître son cycle dans le milieu naturel, son temps de survie en dehors des huîtres (dans l'eau et dans le sédiment), identifier des hôtes secondaires, apporterait des éléments peut-être essentiels dans la préservation de l'ostréiculture.

Annexe

Annexe 1

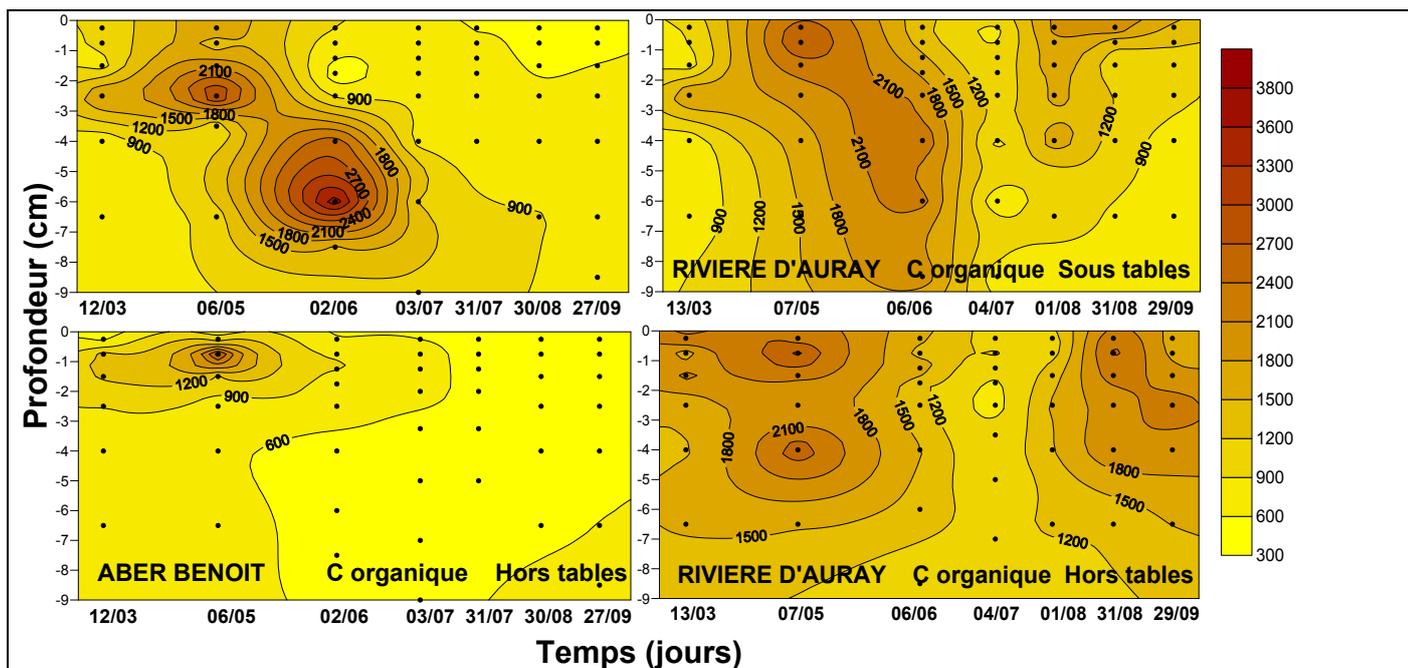


Figure 51 : Distribution du carbone organique dans les sédiments pour les sites sous tables et hors tables de l'Aber Benoît et de la Rivière d'Auray tout au long de la période d'étude (Juillet, Août et Septembre 2007 et Mars, Mai et Juin 2008). Les concentrations sont exprimées en $\mu\text{mol g}^{-1}$.

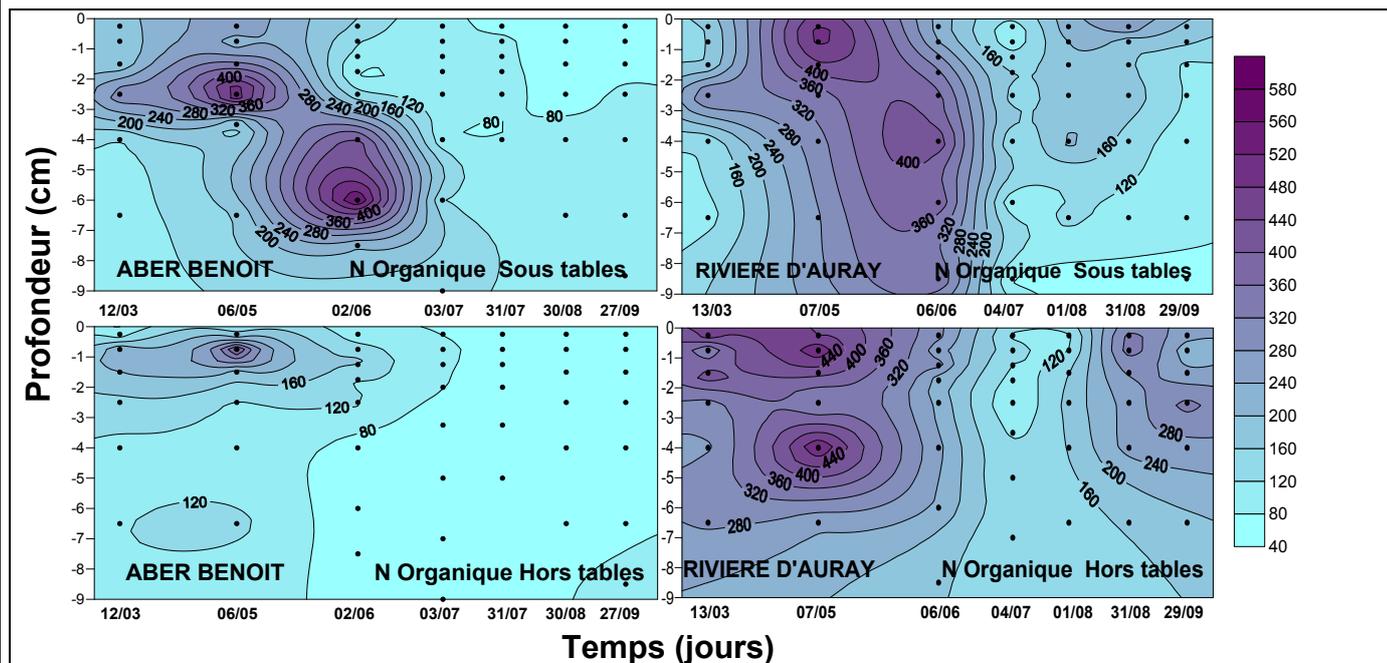


Figure 52 : Distribution de l'azote organique dans les sédiments pour les sites sous tables et hors tables de l'Aber Benoît et de la Rivière d'Auray tout au long de la période d'étude (Juillet, Août et Septembre 2007 et Mars, Mai et Juin 2008). Les concentrations sont exprimées en $\mu\text{mol g}^{-1}$.

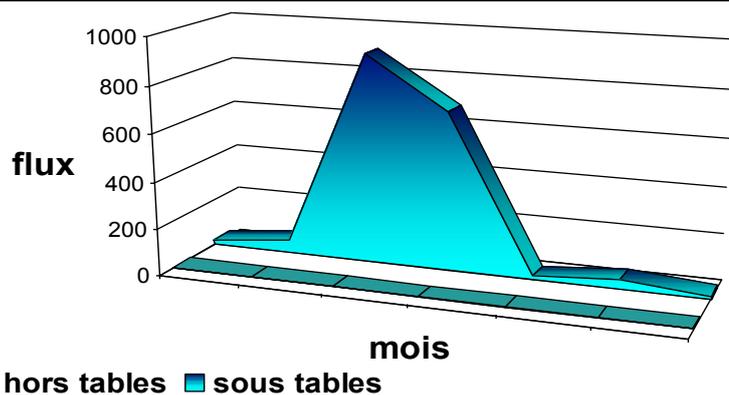
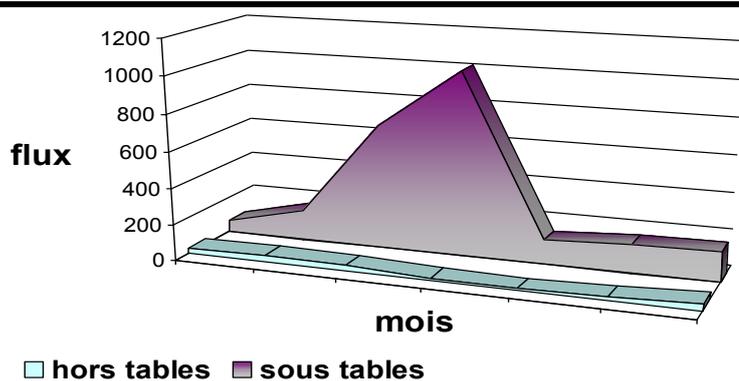
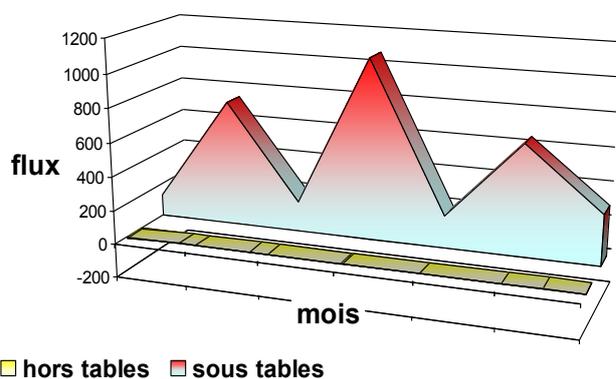
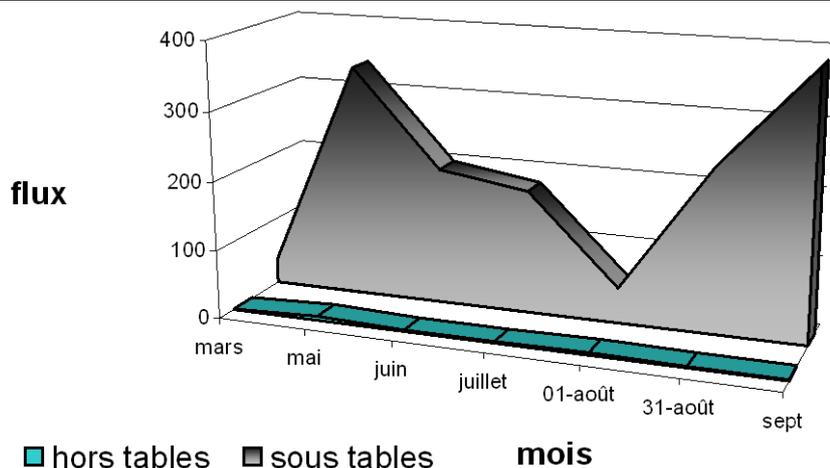
A : Flux de PO_4^{3-} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$)B : Flux de NH_4^+ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$)C : Flux de HS^- ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$)

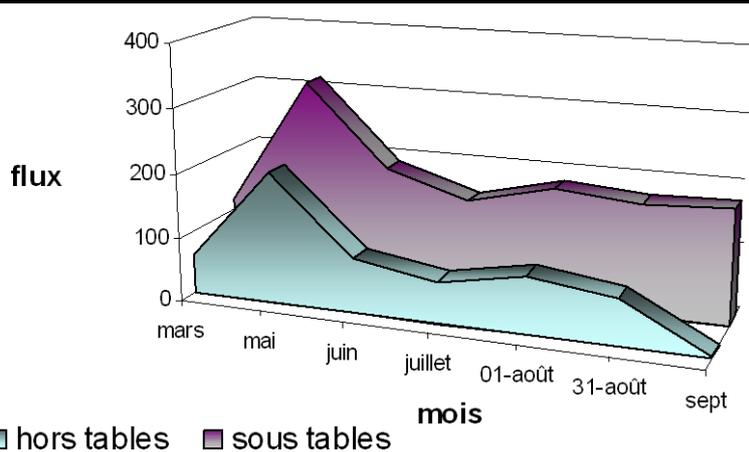
Figure 53 : Comparaison saisonnière des flux hors tables et sous tables du site de l'Aber Benoît (A= Phosphate (PO_4^{3-}); B= Ammonium (NH_4^+); C= Sulfure (HS^-))

Les flux ont été calculés en utilisant la première loi de Fick adaptée au sédiment (Krom et Berner, 1980) et à partir du gradient de concentration à l'interface eau-sédiment. Les flux de sulfure sont calculés avec le gradient de concentration à l'interface zone oxygène-anoxique. Les flux sont exprimés en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$.

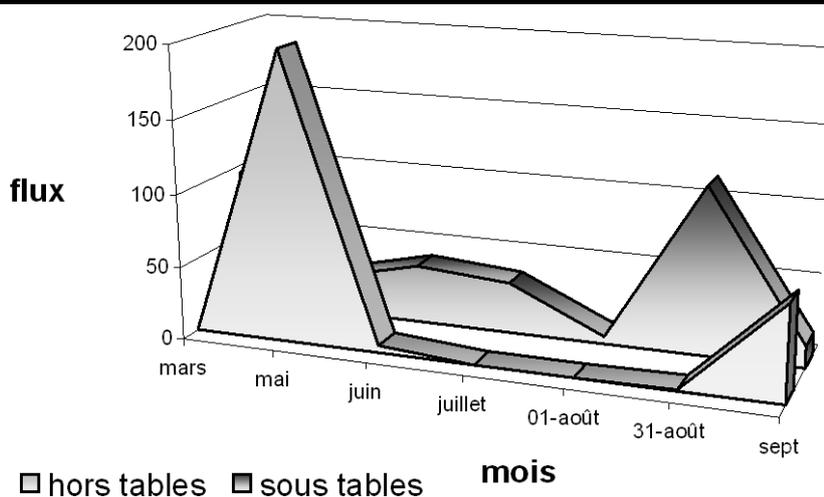
Annexe



Flux de PO_4^{3-} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$)



Flux de NH_4^+ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$)



Flux de HS ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$)

Figure 54 : Comparaison saisonnière des flux hors tables et sous tables du site de la Rivière d'Auray (A= Phosphate (PO_4^{3-}) ; B= Ammonium (NH_4^+) ; C= Sulfure (HS^-))

Les flux ont été calculés en utilisant la première loi de Fick adaptée au sédiment (Krom et Berner, 1980) et à partir du gradient de concentration à l'interface eau-sédiment. Les flux de sulfure sont calculés avec le gradient de concentration à l'interface zone oxicque-anoxique. Les flux sont exprimés en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$.

Annexe 2

A Protocole d'amplification PCR (conditions DGGE) : amorces universelles

Ajouter dans le microtubes, les produits dans l'ordre suivant :

Réactifs	Concentration du réactif	Volume du réactif à pipeter	Concentration finale dans le tube
H2O milliQ stérile		Qsp 50 µl	
Tampon réactionnel	10x	5	1x
DNTP mix*	10 mM chaque	1	0.2 mM chaque
MgCl ₂	50 mM	1.5	1.5 mM
Amorce forward	100 µM	0.5	1 µM
Amorce reverse	100 µM	0.5	1 µM
Taq DNA polymerase	5U/µl	0.4	2 U/50µl
Stoffel fragment (si besoin)	10U/µl	0.2	2U/50µl
ADN		20 à 100 ng (1à5 ng pour ADNg souche pure)	

- mélange réalisé tel que : 10 µl de chaque (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) à 100 mM + 460 µl d'eau milliQ stérile.

GENE 16S
MUYZER

CARACTERISTIQUE DE LA PCR

Particularité : TOUCHDOWN
 Nom des amorces amorce forward : MUYZERfGC (341F-GC)
 amorce reverse : MUYZERr (518R)

Taille du fragment : 234 pb

Quantité d'ADN souche pure : 1 à 5 ng
 sédiment : 20 à 100 ng

PROGRAMME PCR

1	94°C	5 min	
2	94°C	30 sec	} 10 cycles
3	65°C-56°C (1°/cycle)	30 sec	
4	72°C	1 min	
5	92°C	30 sec	} 20 cycles
6	55°C	30 sec	
7	72°C	1 min	
8	72°C	30 min	
9	15°C	pause	

Annexe

GEL ACRYL

% acryl 37/5/1	8 %
Gradient dénaturant	40 %– 80%
Épaisseur gel	1mm
Peigne	20 puits
température	60°C
Voltage	80V
Durée migration	18h
Dépôt : - souche pure	10 ng
- sédiment	80 à 120 ng
Coloration : sybrgold, 30 ml à 1/10000 sur un gel pendant 30 min	

Références bibliographiques

Références

A

- Alday-Sanz, V., Roque, A. & Turnbull, J. F. (2002).** Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* **48**, 91-99.
- Aller, R. C. & Yingst, J. Y. (1980).** Relationship between microbial distributions and the anaerobic decomposition of organic matter surface sediments of Long-Island sound , USA. *Marine Biology* **56**, 29-42.
- Alm, E. W., Burke, J. & Hagan, E. (2006).** Persistence and potential growth of the fecal indicator bacteria, *Escherichia coli*, in shoreline sand at Lake Huron. *Journal of Great Lakes Research* **32**, 401-405.
- Alsina, M. & Blanch, A. R. (1994).** Improvement and update of a set of keys biochemical identification of *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology* **77**, 719-721.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J. H., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389-3402.
- Amel, B. K. N., Amine, B. & Amina, B. (2008).** Survival of *Vibrio fluvialis* in seawater under starvation conditions. *Microbiol Res* **163**, 323-328.
- Aminot, A. & Kerouel, R. (2004).** Hydrologie des écosystèmes marins : Paramètres et analyses. In *Méthodes d'analyses en milieu marin*, pp. 335. Edited by Ifremer.
- Aminot, A. & Kerouel, R. (2006).** The determination of total dissolved free primary amines in seawater: Critical factors, optimized procedure and artefact correction. *Marine Chemistry* **98**, 223-240.
- Asami, H., Aida, M. & Watanabe, K. (2005).** Accelerated sulfur cycle in coastal marine sediment beneath areas of intensive shellfish aquaculture. *Appl Environ Microbiol* **71**, 2925-2933.
- Austin, B. & Zhang, X. H. (2006).** *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology* **43**, 119-124.
- Ayres, P. A. & Barrow, G. I. (1978).** Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in british coastal waters - report of collaborative study 1975-1976. *Journal of Hygiene* **80**, 281-294.

B

- Bachere, E., Mialhe, E., Noel, D., Boulo, V., Morvan, A. & Rodriguez, J. (1995).** Knowledge and research prospects in marine mollusk and crustacean immunology *Aquaculture* **132**, 17-32.
- Bachere, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J. & Romestand, B. (2004).** Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol Rev* **198**, 149-168.

Références

- Barbieri, E., Falzano, L., Fiorentini, C. & other authors (1999).** Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic Coast. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2748-2753.
- Barer, M. R. & Harwood, C. R. (1999).** Bacterial viability and culturability. In *Advances in Microbial Physiology, Vol 41*, pp. 93-137. London: Academic Press Ltd.
- Bassler, B. L., Wright, M., Showalter, R. E. & Silverman, M. R. (1993).** Intercellular signaling in *Vibrio harveyi* - Sequence and function of genes regulating expression of luminescence *Molecular Microbiology* **9**, 773-786.
- Bassler, B. L., Wright, M. & Silverman, M. R. (1994).** Sequence and function of luxO, a negative regulator of luminescence in *Vibrio harveyi* *Molecular Microbiology* **12**, 403-412.
- Baudinet, D., Alliot, E., Berland, B., Grenz, C., Plantecuny, M. R., Plante, R. & Salenpicard, C. (1990).** Incidence of mussel culture on biogeochemical fluxes at the sediment-water interface. *Hydrobiologia* **207**, 187-196.
- Beleneva, I. A. & Zhukova, N. V. (2006).** Bacterial communities of some brown and red algae from Peter the Great Bay, the Sea of Japan. *Microbiology* **75**, 348-357.
- Ben-Haim, Y., Thompson, F. L., Thompson, C. C., Cnockaert, M. C., Hoste, B., Swings, J. & Rosenberg, E. (2003).** *Vibrio coralliilyticus* sp nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**, 309-315.
- Berthelin, C., Kellner, K. & Mathieu, M. (2000).** Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **125**, 359-369.
- Bhowmick, R., Ghosal, A. & Chatterjee, N. S. (2007).** Effect of environmental factors on expression and activity of chitinase genes of vibrios with special reference to *Vibrio cholerae*. *J Appl Microbiol* **103**, 97-108.
- Bianchi, A. & Giuliano, L. (1996).** Enumeration of viable bacteria in the marine pelagic environment. *Appl Environ Microbiol* **62**, 174-177.
- Blackwell, K. D. & Oliver, J. D. (2008).** The ecology of *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus* in North Carolina estuaries. *J Microbiol* **46**, 146-153.
- Boenigk, J. (2004).** A disintegration method for direct counting of bacteria in clay-dominated sediments: dissolving silicates and subsequent fluorescent staining of bacteria. *J Microbiol Methods* **56**, 151-159.
- 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.

Références

Bogosian, G., Morris, P. J. L. & O'Neil, J. P. (1998). A mixed culture recovery method indicates that enteric bacteria do not enter the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1736-1742.

Bowser, P. R., Rosemark, R. & Reiner, C. R. (1981). A preliminary report of vibriosis in cultures American lobsters, *Homarus americanus* *Journal of Invertebrate Pathology* **37**, 80-85.

Brew, K., Dinakarpanian, D. & Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1477**, 267-283.

Buller, N. B. (2004). *Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual.*: CABI publishing.

C

Cabello, A. E., Espejo, R. T. & Romero, J. (2005). Tracing *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Tiostrea chilensis*) using a Green Fluorescent Protein tag. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **327**, 157-166.

Calkins, C. C. & Sloane, B. F. (1995). Mammalian cysteine protease inhibitors - biochemical properties and possible roles in tumor progression A. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **376**, 71-80.

Caron, G. N. V. & Badley, R. A. (1995). Viability assessment of bacteria in mixed populations using flow-cytometry *Journal of Microscopy-Oxford* **179**, 55-66.

Cerda-Cuellar, M., Jofre, J. & Blanch, A. R. (2000). A selective medium and a specific probe for detection of *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 855-859.

Cerenius, L. & Soderhall, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *immunological reviews* **198**, 116-126.

Cervino, J. M., Hayes, R., Goreau, T. J. & Smith, G. W. (2004). Zooxanthellae regulation in yellow blotch/band and other coral diseases contrasted with temperature related bleaching: In situ destruction vs expulsion. *Symbiosis* **37**, 63-85.

Chaiyanan, S., Huq, A., Maugel, T. & Colwell, R. R. (2001). Viability of the Nonculturable *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Syst Appl Microbiol* **24**, 331-341.

Chaiyanan, S., Grim, C., Maugel, T., Huq, A. & Colwell, R. R. (2007). Ultrastructure of coccoid viable but non-culturable *Vibrio cholerae*. *Environ Microbiol* **9**, 393-402.

Chen, C. Y., Wu, K. M., Chang, Y. C. & other authors (2003). Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Research* **13**, 2577-2587.

Chen, S. Y., Jane, W. N., Chen, Y. S. & Wong, H. C. (2009). Morphological changes of *Vibrio parahaemolyticus* under cold and starvation stresses. *Int J Food Microbiol* **129**, 157-165.

Références

- 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. *Journal of Shellfish Research* **19**, 353-359.
- Cheng, T. C. (1996).** Hemocytes: Forms and functions. The Eastern Oyster *Crassostrea virginica* (V.S Kennedy, R.I.E. Newell, & A.F. Eble, eds.) College Park, MD, USA pp. 299-333.
- Cheng, T. C. (2000).** Cellular defense mechanisms in oysters. In *Recent advances in marine biotechnology: immunobiology and pathology*, pp. 43-83. Edited by N. R. e. In Fingerman M.: Enfield (USA) Sciences Publishers Inc., .
- Chiang, M. L. & Chou, C. C. (2009).** Survival of *Vibrio parahaemolyticus* under environmental stresses as influenced by growth phase and pre-adaptation treatment. *Food Microbiology* **26**, 391-395.
- Chiavelli, D. A., Marsh, J. W. & Taylor, R. K. (2001).** The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3220-3225.
- Chu, F.-L. E. (2000).** Defense mechanism of marine bivalves. In *Recent advances in marine biotechnology: immunobiology and pathology*, pp. 1-42. Edited by N. R. e. In Fingerman M.: Enfield (USA) , Sciences Publishers Inc.
- Ciacci, C., Citterio, B., Betti, M., Canonico, B., Roch, P. & Canesi, L. (2009).** Functional differential immune responses of *Mytilus galloprovincialis* to bacterial challenge. *Comp Biochem Physiol B-Biochem Mol Biol* **153**, 365-371.
- Cifuentes, A., Anton, J., Benloch, S., Donnelly, A., Herbert, R. A. & Rodriguez-Valera, F. (2000).** Prokaryotic diversity in *Zostera noltii*-colonized marine sediments. *Appl Environ Microbiol* **66**, 1715-1719.
- Clarke, K. R. (1992).** Nonparametric multivariate analyses of changes in community structure In *International Workshop on Solutions to Environmental Problems*, pp. 117-143. Sydney, Australia: Blackwell Science.
- Clarke, K. R. & Warwick, R. M. (2001).** A further biodiversity index applicable to species lists: variation in taxonomic distinctness. *Mar Ecol-Prog Ser* **216**, 265-278.
- Cline, J. D. (1969).** Spectrophotometric Determination of Hydrogen Sulfide in Natural Waters. *Limnol and Oceanogr* **14**, 454-458.
- Colwell, R. R. & Liston, J. (1960).** Microbiology of shellfish. Bacteriological study of the natural flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Applied Microbiology* **8**, 5.
- Colwell, R. R., Seidler, R. J., Kaper, J. & other authors (1981).** Occurrence of *Vibrio Cholerae* serotype-O1 in Maryland and Louisiana estuaries *Appl Environ Microbiol* **41**, 555-558.

Références

- Colwell, R. R., Brayton, P. R., Grimes, D. J., Roszak, D. B., Huq, S. A. & Palmer, L. M. (1985).** Viable but non culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment - Implications for release of genetically engineered microorganisms *Bio-Technology* **3**, 817-820.
- Comps, M., Bonami, J., Vago, C. & Razet, D. (1976).** La mise en évidence d'une infection virale chez l'huître portugaise à l'occasion de l'épizootie de 1970-1974. *Science et Pêche, Pêche maritime* **256**, 13-15.
- Cook, D. W., O'Leary, P., Hunsucker, J. C., Sloan, E. M., Bowers, J. C., Blodgett, R. J. & DePaola, A. (2002).** *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in US retail shell oysters: A national survey from June 1998 to July 1999. *J Food Prot* **65**, 79-87.
- Costerton, J. W. (1995).** Overview of microbial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology* **15**, 137-140.
- Courtois, S., Frostegard, A., Goransson, P., Depret, G., Jeannin, P. & Simonet, P. (2001).** Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. *Environ Microbiol* **3**, 431-439.

D

- Daniels, N. A., MacKinnon, L., Bishop, R. & other authors (1999).** *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. In *39th Interdisciplinary Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)*, pp. 1661-1666. San Francisco, California.
- Datta, A. R., Wentz, B. A. & Hill, W. E. (1988).** Identification and enumeration of beta-hemolytic *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated dairy-products *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **71**, 673-675.
- Dauga, C. (2002).** Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of Enterobacteriaceae: a model molecule for molecular systematic studies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 531-547.
- de la Pena, L. D., Koube, H., Nakai, T. & Muroga, K. (1997).** Detection of *Vibrio penaeicida* in kuruma prawn after transport. *Fish Pathology* **32**, 233-234.
- Deepanjali, A., Kumar, H. S. & Karunasagar, I. (2005).** Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India. *Appl Environ Microbiol* **71**, 3575-3580.
- Deere, D., Porter, J., Pickup, R. W. & Edwards, C. (1996).** Survival of cells and DNA of *Aeromonas salmonicida* released into aquatic microcosms. *Journal of Applied Bacteriology* **81**, 309-318.
- DePaola, A., Hopkins, L. H., Peeler, J. T., Wentz, B. & McPhearson, R. M. (1990).** Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in United States coastal waters and oysters. *Appl Environ Microbiol* **56**, 2299-2302.

Références

- DePaola, A., Kaysner, C. A., Bowers, J. & Cook, D. W. (2000).** Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). *Appl Environ Microbiol* **66**, 4649-4654.
- DePaola, A., Nordstrom, J. L., Bowers, J. C., Wells, J. G. & Cook, D. W. (2003).** Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1521-1526.
- Deslous-Paoli, J. M., Souchu, P., Mazouni, N., Juge, C. & Dagault, F. (1996).** Relationship between environment and resources: impact of shellfish farming on a Mediterranean lagoon (Thau, France). In *Annual Meeting of the National-Coastal-Oceanography-Programme - National Research Project on Coastal Zones*, pp. 831-843. Nantes, France.
- Diaper, J. P. & Edwards, C. (1994).** Flow cytometric detection of viable bacteria in compost *FEMS Microbiol Ecol* **14**, 213-220.
- Diaz, R. J. & Rosenberg, R. (1995).** Marine benthic hypoxia: A review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. In *Oceanography and Marine Biology - an Annual Review, Vol 33*, pp. 245-303.
- Diggles, B. K., Carson, J., Hine, P. M., Hickman, R. W. & Tait, M. J. (2000).** *Vibrio* species associated with mortalities in hatchery-reared turbot (*Colistium nudipinnis*) and brill (*C. guntheri*) in New Zealand. *Aquaculture* **183**, 1-12.
- Disalvo, L. H., Blecka, J. & Zebal, R. (1978).** *Vibrio anguillarum* larval mortality in a California coastal shellfish hatchery *Appl Environ Microbiol* **35**, 219-221.
- Dollhopf, S. L., Hashsham, S. A., Dazzo, F. B., Hickey, R. F., Criddle, C. S. & Tiedje, J. M. (2001).** The impact of fermentative organisms on carbon flow in methanogenic systems under constant low-substrate conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**, 531-538.
- Donaghay, P. L. & Klos, E. (1985).** Physical, chemical and biological responses to simulated wind and tidal mixing in experimental marine ecosystems. *Mar Ecol-Prog Ser* **26**, 35-45.
- Dorigo, U., Volatier, L. & Humbert, J. F. (2005).** Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research* **39**, 2207-2218.
- Du, M., Chen, J. X., Zhang, X. H., Li, A. J. & Li, Y. (2007).** Characterization and resuscitation of viable but nonculturable *Vibrio alginolyticus* VIB283. *Archives of Microbiology* **188**, 283-288.
- Dunlap, P. V. & Ast, J. C. (2005).** Genomic and phylogenetic characterization of luminous bacteria symbiotic with the deep-sea fish *Chlorophthalmus albatrossis* (Aulopiformes : Chlorophthalmidae). *Appl Environ Microbiol* **71**, 930-939.

E

- Ehrenhauss, S., Witte, U., Janssen, F. & Huettel, M. (2004).** Decomposition of diatoms and nutrient dynamics in permeable North Sea sediments. *Continental Shelf Research* **24**, 721-737.

Références

- Eiler, A. & Bertilsson, S. (2006).** Detection and quantification of *Vibrio* populations using denaturant gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Methods* **67**, 339-348.
- Eiler, A., Johansson, M. & Bertilsson, S. (2006).** Environmental influences on *Vibrio* populations in northern temperate and boreal coastal waters (Baltic and Skagerrak Seas). *Appl Environ Microbiol* **72**, 6004-6011.
- Eiler, A., Gonzalez-Rey, C., Allen, S. & Bertilsson, S. (2007).** Growth response of *Vibrio cholerae* and other *Vibrio* spp. to cyanobacterial dissolved organic matter and temperature in brackish water. *FEMS Microbiol Ecol* **60**, 411-418.
- Enger, O., Husevag, B. & Goksoyr, J. (1989).** Presence of the fish pathogen *Vibrio salmonicida* in fish farm sediments *Appl Environ Microbiol* **55**, 2815-2818.
- Enger, O., Hoff, K. A., Schei, G. H. & Dundas, I. (1990).** Starvation survival of the fish pathogenic bacteria *Vibrio anguillarum* and *Vibrio salmonicida* in marine environments In *Symp on Nutrient Limitation : Global Responses and Prokaryotic Development*, pp. 215-220. Gothenburg, Sweden: Elsevier Science Bv.
- Enriquez-Diaz, M. (2004).** Variabilité et biogénétique de la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, pp. 193. Brest: Thèse, Université de Bretagne Occidentale
- Estes, R. M., Friedman, C. S., Elston, R. A. & Herwig, R. P. (2004).** Pathogenicity testing of shellfish hatchery bacterial isolates on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis Aquat Org* **58**, 223-230.

F

- Faisal, M., MacIntyre, E. A., Adham, K. G., Tall, B. D., Kothary, M. H. & La Peyre, J. F. (1998).** Evidence for the presence of protease inhibitors in eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **121**, 161-168.
- Farto, R., Armada, S. P., Montes, M., Guisande, J. A., Perez, M. J. & Nieto, T. P. (2003).** *Vibrio lentus* associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*). *Journal of Invertebrate Pathology* **83**, 149-156.
- Fischer, E. (1883).** Bildung von Methylenblau als Reaction auf Schwefelwasserstoff. *Chem Ber* **26**, 2234-2236.
- Fisher, M. M. & Triplett, E. W. (1999).** Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4630-4636.
- Fisher, W. S. (1986).** Structures and functions of oyster hemocytes. *Immunity in Invertebrates (ed MBrehelin)* Heidelberg:Springer Verlag, 25 - 35.

Références

- Ford, S. E. & Haskin, H. H. (1987).** Infection and mortality patterns in strains of oysters *Crassostrea virginica* selected for resistance to the parasite *Haplosporidium nelsoni* (msx) *Journal of Parasitology* **73**, 368-376.
- Ford, S. E. & Borrero, F. J. (2001).** Epizootiology and pathology of juvenile oyster disease in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Invertebrate Pathology* **78**, 141-154.
- Forrest, B. M., Keeley, N. B., Hopkins, G. A., Webb, S. C. & Clement, D. M. (2009).** Bivalve aquaculture in estuaries: Review and synthesis of oyster cultivation effects. *Aquaculture* **298**, 1-15.
- Friedman, C. S., Estes, R. M., Stokes, N. A., Burge, C. A., Hargove, J. S., Barber, B. J., Elston, R. A., Burreson, E. M. & Reece, K. S. (2005).** Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Diseases of Aquatic Organisms* **63**, 33-41.
- Fries, J. S., Characklis, G. W. & Noble, R. T. (2006).** Attachment of fecal indicator bacteria to particles in the Neuse River Estuary, NC. *Journal of Environmental Engineering-Asce* **132**, 1338-1345.
- Fries, J. S., Characklis, G. W. & Noble, R. T. (2008).** Sediment-water exchange of *Vibrio* sp and fecal indicator bacteria: Implications for persistence and transport in the Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *Water Research* **42**, 941-950.
- Fryer, S. E. & Bayne, C. J. (1996).** Phagocytosis of latex beads by *Biomphalaria glabrata* hemocytes is modulated in a strain-specific manner by adsorbed plasma components. *Developmental and Comparative Immunology* **20**, 23-37.
- Fukushima, H. & Seki, R. (2004).** Ecology of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in brackish environments of the Sada River in Shimane Prefecture, Japan. *FEMS Microbiol Ecol* **48**, 221-229.

G

- Galtsoff, P. S. (1964).** The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. In *Fishery Bulletin of the fish and wildlife service*.
- Garnier, M., Labreuche, Y., Garcia, C., Robert, A. & 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.
- Garnier, M., Labreuche, Y. & Nicolas, J. L. (2008).** Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp *francensis* subsp nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Syst Appl Microbiol* **31**, 358-365.
- Genfa, Z., Dasgupta, P. K. & Dong, S. (1989).** Measurement of atmospheric ammonia *Environmental Science & Technology* **23**, 1467-1474.

Références

- Giovannoni & Rappé (2000).** Evolution, diversity and molecular ecology of marine prokaryotes. In *Microbial Ecology of the Oceans* D L Kirchman ed G.
- Glude, J. B. (1975).** A summary report of Pacific coast oyster mortality investigations 1965-1972. In *Proceedings of the 3rd US-Japan meeting on Aquaculture in Tokyo, Japan, October 15-16 1974*, pp. 1-28.
- Gomez-Leon, J., Villamil, L., Lemos, M. L., 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.
- Gooday, A. J., Turley, C. M. & Allen, J. A. (1990).** Responses by benthic organisms to inputs of organic material to ocean-floor - A review. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series a-Mathematical Physical and Engineering Sciences* **331**, 119-138.
- Gooday, G. W. (1990).** The ecology of chitin degradation *Adv Microb Ecol* **11**, 387-430.
- Gooday, G. W. (1991).** Chitinases. *Acs Symposium Series* **460**, 478-485.
- Gouletquer, P., Soletchnik, P., Moine, O. L., Geairon, D., Faury, N. & Taillade, S. (1998).** Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oléron (France). In *Ices Statutory Meeting, Population Biology, Mariculture Committee CM*, pp. CC14-CC20.
- Gourmelon, M., Cillard, J. & Pommepuy, M. (1994).** Visible light damage to *Escherichia coli* in seawater - Oxidative stress hypothesis *Journal of Applied Bacteriology* **77**, 105-112.
- Gray, J. P. & Herwig, R. P. (1996).** Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Appl Environ Microbiol* **62**, 4049-4059.
- Gray, J. S., Wu, R. S. S. & Or, Y. Y. (2002).** Effects of hypoxia and organic enrichment on the coastal marine environment. *Mar Ecol-Prog Ser* **238**, 249-279.
- Grimes, D. J., Johnson, C. N., Dillon, K. S., Flowers, A. R., Noriega, N. F. & Berutti, T. (2009).** What Genomic Sequence Information Has Revealed About *Vibrio* Ecology in the Ocean-A Review. *Microb Ecol* **58**, 447-460.
- Grossart, H. P., Levold, F., Allgaier, M., Simon, M. & Brinkhoff, T. (2005).** Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environ Microbiol* **7**, 860-873.
- Gueguen, Y., Herpin, A., Aumelas, A. & other authors (2006).** Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas* - Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 313-323.
- Gugliandolo, C., Irrera, G. P., Lentini, V. & Maugeri, T. L. (2008).** Pathogenic *Vibrio*, *Aeromonas* and *Arcobacter* spp. associated with copepods in the Straits of Messina (Italy). *Marine Pollution Bulletin* **56**, 600-606.

Références

Guisande, J. A., Montes, M., Farto, R., Armada, S. P., Perez, M. J. & Nieto, T. P. (2004). A set of tests for the phenotypic identification of culturable bacteria associated with Galician bivalve mollusc production. *J Shellfish Res* **23**, 599-609.

Guo, X. M., Hedgecock, D., Hershberger, W. K., Cooper, K. & Allen, S. K. (1998). Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Evolution* **52**, 394-402.

H

Hammer, B. K. & Bassler, B. L. (2003). Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology* **50**, 101-114.

Hanlon, R. T., Forsythe, J. W., Cooper, K. M., Dinuzzo, A. R., Folse, D. S. & Kelly, M. T. (1984). Fatal penetrating skin ulcers in laboratory-reared octopuses *Journal of Invertebrate Pathology* **44**, 67-83.

Hansen, M. H., Ingvorsen, K. & JÆrgensen, B. (1978). Mechanisms of hydrogen sulfide release from coastal marine sediments to the atmosphere. *Limnol Oceanogr* **23** 68-76.

Hanzelka, B. L., Parsek, M. R., Val, D. L., Dunlap, P. V., Cronan, J. E. & Greenberg, E. P. (1999). Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. *Journal of Bacteriology* **181**, 5766-5770.

Harriague, A. C., Di Brino, M., Zampini, M., Albertelli, G., Pruzzo, C. & Mistic, C. (2008). Vibrios in association with sedimentary crustaceans in three beaches of the northern Adriatic Sea (Italy). *Marine Pollution Bulletin* **56**, 574-579.

Harvell, C. D., Kim, K., Burkholder, J. M. & other authors (1999). Review: Marine ecology - Emerging marine diseases - Climate links and anthropogenic factors. *Science* **285**, 1505-1510.

Hayashi, K., Moriwaki, J., Sawabe, T., Thompson, F. L., Swings, J., Gudkovs, N., Christen, R. & Ezura, Y. (2003). *Vibrio superstes* sp nov., isolated from the gut of Australian abalones *Haliotis laevigata* and *Haliotis rubra*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**, 1813-1817.

Haygood, M. G., Tebo, B. M. & Nealson, K. H. (1984). Luminous bacteria of a monocentrid fish (*Monocentris japonicus*) and 2 anomalopid fishes (*Photoblepharon palpebratus* and *Kryptophanaron alfredi*) population sizes and growth within the light organs and rates of release into the seawater. *Mar Biol* **78**, 249-254.

Hearing, V. J. & Tsukamoto, K. (1991). Enzymatic control of pigmentation in mammals. *Faseb Journal* **5**, 2902-2909.

Heidelberg, J. F., Eisen, J. A., Nelson, W. C. & other authors (2000). DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**, 477-483.

Hellyer, T. J., DesJardin, L. E., Hehman, G. L., Cave, M. D. & Eisenach, K. D. (1999). Quantitative analysis of mRNA as a marker for viability of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **37**, 290-295.

Références

- Henke, J. M. & Bassler, B. L. (2004a).** Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology* **186**, 6902-6914.
- Henke, J. M. & Bassler, B. L. (2004b).** Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology* **186**, 3794-3805.
- Héral, M. (1989).** L'ostréiculture française traditionnelle. In *Aquaculture*, pp. 347-397. Paris, Barnabé (Coord), Lavoisier (ed).
- Herring, P. J. & Locket, N. A. (1978).** Luminescence and photophores of Euphausiid Crustaceans *Journal of Zoology* **186**, 431-462.
- Hine, P. M. (1996).** Southern hemisphere mollusc diseases and an overview of associated risk assessment problems. *Revue Scientifique Et Technique De L'Office International Des Epizooties* **15**, 563-577.
- Hoff, K. A. (1989).** Survival of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio salmonicida* at different salinities *Appl Environ Microbiol* **55**, 1775-1786.
- Howland, K. H. & Cheng, T. C. (1982).** Identification of bacterial chemoattractants for oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology* **39**, 123-132.
- Hsieh, J. L., Fries, J. S. & Noble, R. T. (2004).** *Vibrio* and phytoplankton dynamics during the summer of 2004 in a eutrophying estuary. In *Conference on Eutrophication and Pathogen Impacts in New Jersey Coastal Bay*, pp. S102-S109. New Brunswick, NJ: Ecological Soc Amer.
- Hsieh, J. L., Fries, J. S. & Noble, R. T. (2008).** Dynamics and predictive modelling of *Vibrio* spp. in the Neuse river estuary, north carolina, USA. *Environ Microbiol* **10**, 57-64.
- Hunt, D. E., Gevers, D., Vahora, N. M. & Polz, M. F. (2008).** Conservation of the chitin utilization pathway in the Vibrionaceae. *Appl Environ Microbiol* **74**, 44-51.
- Huq, A., Small, E. B., West, P. A., Huq, M. I., Rahman, R. & Colwell, R. R. (1983).** Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods *Appl Environ Microbiol* **45**, 275-283.
- Huq, A., Huq, S. A., Grimes, D. J., Obrien, M., Chu, K. H., Capuzzo, J. M. & Colwell, R. R. (1986).** Colonisation of the gut of the blue-crab (*Callinectes sapidus*) by *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol* **52**, 586-588.
- Huq, A., Colwell, R. R., Rahman, R., Ali, A., Chowdhury, M. A. R., Parveen, S., Sack, D. A. & Russekcohen, E. (1990).** Detection of *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment by fluorescent monoclonal antibody and culture methods *Appl Environ Microbiol* **56**, 2370-2373.
- Huq, A. & Colwell, R. R. (1996).** A microbiological paradox: Viable but nonculturable bacteria with special reference to *vibrio cholerae*. *J Food Prot* **59**, 96-101.
- Huq, A., Sack, R. B., Nizam, A. & other authors (2005).** Critical factors influencing the occurrence of *Vibrio cholerae* in the environment of Bangladesh. *Appl Environ Microbiol* **71**, 4645-4654.

Références

Huvet, A., Boudry, P., Ohresser, M., Delsert, C. & Bonhomme, F. (2000). Variable microsatellites in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* and other cupped oyster species. *Animal Genetics* **31**, 71-72.

I

Ishimaru, K., Akagawamatsushita, M. & Muroga, K. (1995). *Vibrio penaeicida* sp nov, a pathogen of Kuruma prawns (*Penaeus japonicus*) *Int J Syst Bacteriol* **45**, 134-138.

Ito, H., Uchida, I., Sekizaki, T. & Terakado, N. (1995). A specific oligonucleotide probe based on 5S ribosomal-RNA sequences for identification of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Veterinary Microbiology* **43**, 167-171.

J

Jagow, J. & Hill, W. E. (1986). Enumeration by DNA colony hybridization of virulent *Yersinia enterocolitica* colonies in artificially contaminated food. *Appl Environ Microbiol* **51**, 441-443.

Jensen, S. I., Kuhl, M. & Prieme, A. (2007). Different bacterial communities associated with the roots and bulk sediment of the seagrass *Zostera marina*. *FEMS Microbiol Ecol* **62**, 108-117.

Jiang, S. C. (2001). *Vibrio cholerae* in recreational beach waters and tributaries of Southern California. *Hydrobiologia* **460**, 157-164.

Jiang, S. C. & Fu, W. (2001). Seasonal abundance and distribution of *Vibrio cholerae* in coastal waters quantified by a 16S-23S intergenic spacer probe. *Microb Ecol* **42**, 540-548.

Jiang, X. P. & Chai, T. J. (1996). Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1300-1305.

Jones, B. W. & Nishiguchi, M. K. (2004). Counterillumination in the hawaiian bobtail squid, *Euprymna scolopes* Berry (Mollusca : Cephalopoda). *Mar Biol* **144**, 1151-1155.

Jores, J., Stephan, R., Knabner, D., Gelderblom, H. R. & Lewin, A. (2003). Isolation of *Vibrio vulnificus* and atypical *Vibrio* from surface water of the Baltic Sea in Germany. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* **116**, 396-400.

Joseph, S. W., Colwell, R. R. & Kaper, J. B. (1982). *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios *Crc Critical Reviews in Microbiology* **10**, 77-124.

Joux, F., Lebaron, P. & Troussellier, M. (1997). Succession of cellular states in a *Salmonella typhimurium* population during starvation in artificial seawater microcosms. *FEMS Microbiol Ecol* **22**, 65-76.

K

Références

- Kaspar, C. W. & Tamplin, M. L. (1993).** Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio Vulnificus* in seawater and shellfish *Appl Environ Microbiol* **59**, 2425-2429.
- Kater, B. J., Dubbeldam, M. & Postma, J. F. (2006).** Ammonium toxicity at high pH in a marine bioassay using *Corophium volutator*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **51**, 347-351.
- Kaufman, G. E., Bej, A. K., Bowers, J. & DePaola, A. (2003).** Oyster-to-oyster variability in levels of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Food Prot* **66**, 125-129.
- Kawahara, N., Shigematsu, K., Miyadai, T. & Kondo, R. (2009).** Comparison of bacterial communities in fish farm sediments along an organic enrichment gradient. *Aquaculture* **287**, 107-113.
- Kaysner, C. A., Abeyta, C., Wekell, M. M., Depaola, A., Stott, R. F. & Leitch, J. M. (1987).** Virulent strains of *Vibrio vulnificus* isolated from estuaries of the United-States West coast *Appl Environ Microbiol* **53**, 1349-1351.
- Keer, J. T. & Birch, L. (2003).** Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *J Microbiol Methods* **53**, 175-183.
- Kemp, P. F. (1990).** The fate of benthic bacterial production *Reviews in Aquatic Sciences* **2**, 109-124.
- Kerouel, R. & Aminot, A. (1997).** Fluorometric determination of ammonia in sea and estuarine waters by direct segmented flow analysis. *Marine Chemistry* **57**, 265-275.
- Keyhani, N. O. & Roseman, S. (1999).** Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **1473**, 108-122.
- Kierek, K. & Watnick, P. I. (2003).** Environmental determinants of *Vibrio cholerae* biofilm development. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5079-5088.
- Kim, B. S., Oh, H. M., Kang, H., Park, S. S. & Chun, J. (2004).** Remarkable bacterial diversity in the tidal flat sediment as revealed by 16S rDNA analysis. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **14**, 205-211.
- Kim, S. Y., Lee, S. E., Kim, Y. R., Kim, C. M., Ryu, P. Y., Choy, H. E., Chung, S. S. & Rhee, J. H. (2003).** Regulation of *Vibrio vulnificus* virulence by the LuxS quorum-sensing system. *Molecular Microbiology* **48**, 1647-1664.
- Kirn, T. J., Jude, B. A. & Taylor, R. K. (2005).** A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection. *Nature* **438**, 863-866.
- Kizilkaya, R., Askin, T., Bayrakli, B. & Saglam, N. (2004).** Microbiological characteristics of soils contaminated with heavy metals. *European Journal of Soil Biology* **40**, 95-102.

Références

- Koganazawa, A. (1975).** Present status of studies on the mass mortalities of cultural oysters in Japan and its prevention. In *Proceedings of the 3rd US-Japan meeting on Aquaculture in Tokyo, Japan, October 15-16 1974*, pp. 29-34.
- Kogure, K., Simidu, U. & Taga, N. (1979).** Tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria *Can J Microbiol* **25**, 415-420.
- Krom, M. D. & Berner, R. A. (1980).** The Diffusion Coefficients of Sulfate, Ammonium, and Phosphate ions in anoxic marine sediments *Limnol Oceanogr* **25**, 327-337.
- Krometis, L. A. H., Characklis, G. W., Simmons, O. D., Dilts, M. J., Likirdopulos, C. A. & Sobsey, M. D. (2007).** Intra-storm variability in microbial partitioning and microbial loading rates. *Water Research* **41**, 506-516.
- Kurahashi, M. & Yokota, A. (2002).** A preliminary report of phylogenetic diversity of bacterial strains isolated from marine creatures. *J Gen Appl Microbiol* **48**, 251-259.
- Kuwae, T. & Hosokawa, Y. (1999).** Determination of abundance and biovolume of bacteria in sediments by dual staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole and acridine orange: Relationship to dispersion treatment and sediment characteristics. *Appl Environ Microbiol* **65**, 3407-3412.
- L**
- La Rosa, T., Mirto, S., Mazzola, A. & Maugeri, T. L. (2004).** Benthic microbial indicators of fish farm impact in a coastal area of the Tyrrhenian Sea. *Aquaculture* **230**, 153-167.
- Labreuche, Y. (2006).** Caractérisation de la virulence d'une souche de *Vibrio aestuarianus*, pathogène de l'huître *Crassostrea gigas* pp. 277. Brest Université de Bretagne Occidentale - Ecole Doctorale des Sciences de la Mer.
- 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*. *Dev Comp Immunol* **30**, 367-379.
- Lambert, C., Nicolas, J. L. & Bultel, V. (2001).** Toxicity to bivalve hemocytes of pathogenic *Vibrio* cytoplasmic extract. *Journal of Invertebrate Pathology* **77**, 165-172.
- Lango-Reynoso, F., Devauchelle, N., Le Pennec, M. & Hatt, P. J. (1999).** Elements of reproductive strategy in oysters, *Crassostrea gigas*, from the "Rade de Brest", France. *Invertebrate Reproduction & Development* **36**, 141-144.
- Lango-Reynoso, F., Chavez-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.

Références

- Lasher, C., Dyszynski, G., Everett, K. & other authors (2009).** The Diverse Bacterial Community in Intertidal, Anaerobic Sediments at Sapelo Island, Georgia. *Microb Ecol* **58**, 244-261.
- Le Moullac, G., Fleury, P. G., Le Coz, J. R., Moal, J. & Samain, J. F. (2007).** Effect of sediment nearness on the metabolic enzyme activity and energy state of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* **20**, 279-286.
- 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., Gay, M., Lambert, C., Nicolas, J. L., Gouy, M. & Berthe, F. (2004).** Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus* -related strains based on *gyrB* gene sequences. *Dis Aquat Org* **58**, 143-150.
- 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. *Appl Environ Microbiol* **73**, 777-784.
- Le Roux, F., Zouine, M., Chakroun, N. & other authors (2009).** Genome sequence of *Vibrio splendidus*: an abundant planctonic marine species with a large genotypic diversity. *Environ Microbiol* **11**, 1959-1970.
- Lee, C. M., Lin, T. Y., Lin, C. C., Kohbodi, G. A., Bhattl, A., Lee, R. & Jay, J. A. (2006).** Persistence of fecal indicator bacteria in Santa Monica Bay beach sediments. *Water Research* **40**, 2593-2602.
- Lee, K. K., Yu, S. R., Yang, T. L., Liu, P. C. & Chen, F. R. (1996).** Isolation and characterization of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Letters in Applied Microbiology* **22**, 111-114.
- LeGall, S., Hassen, M. B. & LeGall, P. (1997).** Ingestion of a bacterivorous ciliate by the oyster *Crassostrea gigas*: Protozoa as a trophic link between picoplankton and benthic suspension-feeders. *Mar Ecol-Prog Ser* **152**, 301-306.
- Leippe, M. & Renwranz, L. (1988).** Release of cyto-toxic and agglutinating molecules by mytilus hemocytes *Developmental and Comparative Immunology* **12**, 297-308.
- Li, L. N., Kato, C. & Horikoshi, K. (1999).** Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. *Biodiversity and Conservation* **8**, 659-677.
- Lightner, D. V. & Redman, R. M. (1998).** Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* **164**, 201-220.
- Lilley, B. N. & Bassler, B. L. (2000).** Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and Sigma-54. *Molecular Microbiology* **36**, 940-954.

Références

- Lipp, E. K., Rodriguez-Palacios, C. & Rose, J. B. (2001).** Occurrence and distribution of the human pathogen *Vibrio vulnificus* in a subtropical Gulf of Mexico estuary. *Hydrobiologia* **460**, 165-173.
- Liu, P. C., Lee, K. K., Yii, K. C., Kou, G. H. & Chen, S. N. (1996).** Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*. *Current Microbiology* **33**, 129-132.
- Liu, P. C., Chen, Y. C. & Lee, K. K. (2001).** Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Microbios* **104**, 71-77.
- Lodeiros, C., Bolinches, J., Dopazo, C. P. & Toranzo, A. E. (1987).** Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain *Aquaculture* **65**, 15-29.
- Louis, V. R., Russek-Cohen, E., Choopun, N. & other authors (2003).** Predictability of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol* **69**, 2773-2785.
- Lovelace, T. E., Tubiash, H. S. & Colwell, R. R. (1968).** Quantitative and qualitative commensal bacterial flora of *Crassostrea virginica* in Chesapeake Bay. *Proceedings of the National Shellfish Association* **58**, 5.
- Lupp, C. & Ruby, E. G. (2005).** *Vibrio fischeri* uses two quorum-sensing systems for the regulation of early and late colonization factors. *Journal of Bacteriology* **187**, 3620-3629.

M

- Mahenthiralingam, E., Bischof, J., Byrne, S. K., Radomski, C., Davies, J. E., Av-Gay, Y. & Vandamme, P. (2000).** DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 3165-3173.
- Mahmud, Z. H., Kassu, A., Mohammad, A., Yamato, M., Bhuiyan, N. A., Nair, G. B. & Ota, F. (2006).** Isolation and molecular characterization of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* from the Kii Channel, Japan. *Microbiol Res* **161**, 25-37.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K. & other authors (2003).** Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *Vibrio cholerae*. *Lancet* **361**, 743-749.
- Mallin, M. A., Cahoon, L. B., Toothman, B. R., Parsons, D. C., McIver, M. R., Ortwine, M. L. & Harrington, R. N. (2007).** Impacts of a raw sewage spill on water and sediment quality in an urbanized estuary. *Marine Pollution Bulletin* **54**, 81-88.
- Maloy, A. P., Ford, S. E., Karney, R. C. & Boettcher, K. J. (2007).** *Roseovarius crassostreae*, the etiological agent of Juvenile Oyster Disease (now to be known as *Roseovarius* Oyster Disease) in *Crassostrea virginica*. *Aquaculture* **269**, 71-83.
- Marsh, J. W., Marsh, W., Sun, D. X. & Taylor, R. K. (1996).** Physical linkage of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin secretory and structural subunit gene loci: Identification of the mshG coding sequence. *Infection and Immunity* **64**, 460-465.

- Matz, C. & Kjelleberg, S. (2005).** Off the hook - how bacteria survive protozoan grazing. *Trends in Microbiology* **13**, 302-307.
- Matz, C., McDougald, D., Moreno, A. M., Yung, P. Y., Yildiz, F. H. & Kjelleberg, S. (2005).** Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 16819-16824.
- Maurer, D. & Comps, M. (1986).** Mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon: facteurs du milieu, aspects biochimiques et histologiques. In *Pathology in Marine Aquaculture*, pp. 29-41. Bredene Belgium: Vivares C.P., Bonami J. R. and Jaspers E. (Ed.) European Aquaculture Society, Special Publication N°9.
- Maurer, D., Comps, M. & and His, E. (1986).** Caractéristiques des mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon. *Haliotis* **15**, 8.
- Mazouni, N., Gaertner, J. C. & Deslous-Paoli, J. M. (1996a).** Influence of oyster culture on water column characteristics in a coastal lagoon (Thau, France). In *3rd International Joint Conference on Limnology and Oceanography : Oceans, Rivers and Lakes - Energy and Substance Transfers at Interfaces*, pp. 149-156. Nantes, France.
- Mazouni, N., Gaertner, J. C., DeslousPaoli, J. M., Landrein, S. & dOedenberg, M. G. (1996b).** Nutrient and oxygen exchanges at the water-sediment interface in a shellfish farming lagoon (Thau, France). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **205**, 91-113.
- McBain, A. J., Bartolo, R. G., Catrenich, C. E., Charbonneau, D., Ledder, R. G. & Gilbert, P. (2003).** Growth and molecular characterization of dental plaque microcosms. *Journal of Applied Microbiology* **94**, 655-664.
- McCarty, S. C. & Atlas, R. M. (1993).** Effect of amplicon size on PCR detection of bacteria exposed to chlorine *Pcr-Methods and Applications* **3**, 181-185.
- McDougald, D., Rice, S. A., Weichart, D. & Kjelleberg, S. (1998).** Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiol Ecol* **25**, 1-9.
- Meibom, K. L., Li, X. B. B., Nielsen, A. T., Wu, C. Y., Roseman, S. & Schoolnik, G. K. (2004).** The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 2524-2529.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzet, M. & Roch, P. (2000).** Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 12954-12962.
- Mok, K. C., Wingreen, N. S. & Bassler, B. L. (2003).** *Vibrio harveyi* quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression. *Embo Journal* **22**, 870-881.
- Montagnani, C., Le Roux, F., Berthe, F. & Escoubas, J. M. (2001).** Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms. *Febs Letters* **500**, 64-70.

Références

- Montagnani, C., Tirape, A., Boulo, V. & 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**, 831-839.
- Montanari, M. P., Pruzzo, C., Pane, L. & Colwell, R. R. (1999).** Vibrios associated with plankton in a coastal zone of the Adriatic Sea (Italy). *FEMS Microbiol Ecol* **29**, 241-247.
- Montgomery, M. T. & Kirchman, D. L. (1993).** Role of Chitin-binding proteins in the specific attachment of the marine bacterium *Vibrio harveyi* to Chitin *Appl Environ Microbiol* **59**, 373-379.
- Moorthy, S. & Watnick, P. I. (2004).** Genetic evidence that the *Vibrio cholerae* monolayer is a distinct stage in biofilm development. *Molecular Microbiology* **52**, 573-587.
- Moseley, S. L., Huq, I., Alim, A., So, M., Samadpourmotalebi, M. & Falkow, S. (1980).** Detection of entero-toxigenic *Escherichia coli* by DNA colony hybridization *Journal of Infectious Diseases* **142**, 892-898.
- Moser, D. P. & Neelson, K. H. (1996).** Growth of the facultative anaerobe *Shewanella putrefaciens* by elemental sulfur reduction. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2100-2105.
- Motes, M. L., DePaola, A., Cook, D. W., Veazey, J. E., Hunsucker, J. C., Garthright, W. E., Blodgett, R. J. & Chirtel, S. J. (1998).** Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*). *Appl Environ Microbiol* **64**, 1459-1465.
- MuniesaPerez, M., Jofre, J. & Blanch, A. R. (1996).** Identification of *Vibrio proteolyticus* with a differential medium and a specific probe. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2673-2675.
- Murchelano, R. & Brown, C. (1968).** Bacteriological study of the natural flora of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Invertebrate Pathology* **11**, 1.
- Murray, A. E., Hollibaugh, J. T. & Orrego, C. (1996).** Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2676-2680.
- Muyzer, G., Dewaal, E. C. & Uitterlinden, A. G. (1993).** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction - amplified genes coding for 16S ribosomal RNA *Appl Environ Microbiol* **59**, 695-700.
- Muyzer, G. & Smalla, K. (1998).** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **73**, 127-141.
- N**
- Neto, M. (2007).** Scénarios de gestion de boues dragage de cours d'eau: Rôle des bactéries dans la mobilité des polluants métalliques, pp. 312. Lyon: Institut National des Sciences appliquées de Lyon.
- Nicolas, J. L., Ansquer, D. & Cochard, J. C. (1992).** Isolation and characterisation of pathogenic bacterium specific to Manila clam *Tapes philippinarum* larvae *Dis Aquat Org* **14**, 153-159.

Références

- Nicolas, J. L., Corre, S., Gauthier, G., Robert, R. & Ansquer, D. (1996).** Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis Aquat Org* **27**, 67-76.
- Nicolas, J. L., Basuyaux, O., Mazurie, J. & Thebault, A. (2002).** *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Dis Aquat Org* **50**, 35-43.
- Nordstrom, J. L., Rangdale, R., Vickery, M. C. L., Phillips, A. M. B., Murray, S. L., Wagley, S. & DePaola, A. (2006).** Evaluation of an alkaline phosphatase-labeled oligonucleotide probe for the detection and enumeration of the thermostable-related hemolysin (trh) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Food Prot* **69**, 2770-2772.
- Nottage, A. S. & Birkbeck, T. H. (1987).** Production of proteinase during experimental infection of *Ostrea edulis* 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.
- Nyholm, S. V., Stewart, J. J., Ruby, E. G. & McFall-Ngai, M. J. (2009).** Recognition between symbiotic *Vibrio fischeri* and the haemocytes of *Euprymna scolopes*. *Environ Microbiol* **11**, 483-493.
- O**
- O'Toole, G., Kaplan, H. B. & Kolter, R. (2000).** Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**, 49-79.
- Ogg, J. E., Ryder, R. A. & Smith, H. L. (1989).** Isolation of *Vibrio cholerae* from aquatic birds in Colorado and Utah *Appl Environ Microbiol* **55**, 95-99.
- Olafsen, J. A., Fletcher, T. C. & Grant, P. T. (1992).** Agglutinin activity in pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following in vivo *Vibrio anguillarum* challenge *Developmental and Comparative Immunology* **16**, 123-138.
- Olafsen, J. A., Mikkelsen, H. V., Glaever, H. M. & Hansen, G. H. (1993).** Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marines bivalves at low temperatures *Appl Environ Microbiol* **59**, 1848-1854.
- Oliver, J. D., Warner, R. A. & Cleland, D. R. (1982).** Distribution and ecology of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting marine *Vibrio* in coastal waters of the Southeastern Unites-States I. *Appl Environ Microbiol* **44**, 1404-1414.
- Oliver, J. D., Warner, R. A. & Cleland, D. R. (1983).** Distribution of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting vibrios in the marine environmant. *Appl Environ Microbiol* **45**, 985-998.
- Oliver, J. D. (1995).** The viable but non-culturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Lett* **133**, 203-208.
- Oliver, J. D. & Bockian, R. (1995).** In-vivo resuscitation, and virulence toward mice of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus* *Appl Environ Microbiol* **61**, 2620-2623.

Références

Oliver, J. D., Hite, F., McDougald, D., Andon, N. L. & Simpson, L. M. (1995). Entry into, and resuscitation from the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment. *Appl Environ Microbiol* **61**, 2624-2630.

Oliver, L. M., Fisher, W. S., Ford, S. E., Calvo, L. M. R., Bureson, E. M., Sutton, E. B. & Gandy, J. (1998). Perkinsus marinus tissue distribution and seasonal variation in oysters Crassostrea virginica from Florida, Virginia and New York. *Diseases of Aquatic Organisms* **34**, 51-61.

O'Neill, K. R., Jones, S. H. & Grimes, D. J. (1992). Seasonal incidence of *Vibrio vulnificus* in the great bay estuary of NEW-HAMPSHIRE and MAINE. *Appl Environ Microbiol* **58**, 3257-3262.

P

Paillard, C., Allam, B. & Oubella, R. (2004a). Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis Aquat Org* **59**, 249-262.

Paillard, C., Le Roux, F. & Borreg, J. J. (2004b). Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquatic Living Resources* **17**, 477-498.

Palmer, R. J. & White, D. C. (1997). Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends in Microbiology* **5**, 435-440.

Paranjpye, R. N., Johnson, A. B., Baxter, A. E. & Strom, M. S. (2007). Role of type IV pilins in persistence of *Vibrio vulnificus* in *Crassostrea virginica* oysters. *Appl Environ Microbiol* **73**, 5041-5044.

Parvathi, A., Kumar, H. S. & Karunasagar, I. (2004). Detection and enumeration of *Vibrio vulnificus* in oysters from two estuaries along the southwest coast of India, using molecular methods. *Appl Environ Microbiol* **70**, 6909-6913.

Parvathi, A., Krishna, K., Jose, J., Joseph, N. & Nair, S. (2009). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. *Braz J Microbiol* **40**, 269-275.

Parveen, S., Hettiarachchi, K. A., Bowers, J. C. & other authors (2008). Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters. *Int J Food Microbiol* **128**, 354-361.

Pfeffer, C. S., Hite, M. F. & Oliver, J. D. (2003). Ecology of *Vibrio vulnificus* in estuarine waters of eastern North Carolina. *Appl Environ Microbiol* **69**, 3526-3531.

Polymenakou, P. N., Bertilsson, S., Tselepides, A. & Stephanou, E. G. (2005). Bacterial community composition in different sediments from the Eastern Mediterranean Sea: a comparison of four 16S ribosomal DNA clone libraries. *Microb Ecol* **50**, 447-462.

Polymenakou, P. N., Lampadariou, N., Mandalakis, M. & Tselepides, A. (2009). Phylogenetic diversity of sediment bacteria from the southern Cretan margin, Eastern Mediterranean Sea. *Systematic and Applied Microbiology* **32**, 17-26.

Références

- Pouvreau, S., Bourles, Y., Lefebvre, S., Gangnery, A. & Alunno-Bruscia, M. (2006).** Application of a dynamic energy budget model to the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, reared under various environmental conditions. *Journal of Sea Research* **56**, 156-167.
- Precht, E., Franke, U., Polerecky, L., and Huettel, M., (2004).** Oxygen dynamics in permeable sediments with wave-driven pore water exchange ; *Limnology and Oceanography*, **49**(3), 693-705.
- Prieur, D. (1981).** Les relations entre mollusques bivalves et bactéries hétérotrophes en milieu marin. Etude analytique et expérimentale. In *Thèse de doctorat d'Etat en Sciences Naturelles* pp. 266. Brest:
- Pruzzo, C., Crippa, A., Bertone, S., Pane, L. & Carli, A. (1996).** Attachment of *Vibrio alginolyticus* to chitin mediated by chitin-binding proteins. *Microbiology-Uk* **142**, 2181-2186.
- Pruzzo, C., Tarsi, R., Lleo, M. D., Signoretto, C., Zampini, M., Pane, L., Colwell, R. R. & Canepari, P. (2003).** Persistence of adhesive properties in *Vibrio cholerae* after long-term exposure to sea water. *Environ Microbiol* **5**, 850-858.
- Pruzzo, C., Gallo, G. & Canesi, L. (2005).** Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environ Microbiol* **7**, 761-772.
- R**
- Raghunath, P. & Karunasagar, I. (2007).** Evaluation of an alkaline phosphatase-labeled oligonucleotide probe for detection and enumeration of vibrio spp. from shrimp hatchery environment. *Molecular and Cellular Probes* **21**, 312-315.
- Raghunath, P., Pradeep, B. & Karunasagar, I. (2007).** Rapid detection and enumeration of trh-carrying *Vibrio parahaemolyticus* with the alkaline phosphatase-labelled oligonucleotide probe. *Environ Microbiol* **9**, 266-270.
- Rajendran, N., Matsuda, O., Rajendran, R. & Urushigawa, Y. (1997).** Comparative description of microbial community structure in surface sediments of eutrophic bays. *Marine Pollution Bulletin* **34**, 26-33.
- Ramaiah, N., Ravel, J., Straube, W. L., Hill, R. T. & Colwell, R. R. (2002).** Entry of *Vibrio harveyi* and *Vibrio fischeri* into the viable but nonculturable state. *J Appl Microbiol* **93**, 108-116.
- Ramette, A. (2007).** Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* **62**, 142-160.
- Randa, M. A., Polz, M. F. & Lim, E. (2004).** Effects of temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* population dynamics as assessed by quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol* **70**, 5469-5476.
- Ranjard, L., Poly, F. & Nazaret, S. (2000).** Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology* **151**, 167-177.

Références

- Rawlings, T. K., Ruiz, G. M. & Colwell, R. R. (2007).** Association of *Vibrio cholerae* O1 El Tor and O139 Bengal with the copepods *Acartia tonsa* and *Eurytemora affinis*. *Appl Environ Microbiol* **73**, 7926-7933.
- Rebillard, J. P. & Torre, M. (1993).** Numération bactérienne en épifluorescence par la méthode couplée DAPI-INT: application à un cas concret. *Revue des Sciences de l'eau* **6**, 163-174.
- Reguera, G. & Kolter, R. (2005).** Virulence and the environment: a novel role for *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pili in biofilm formation on chitin. *Journal of Bacteriology* **187**, 3551-3555.
- Reichelt, J. L., Neelson, K. & Hastings, J. W. (1977).** Specificity of symbiosis - Pony fish and luminescent bacteria *Archives of Microbiology* **112**, 157-161.
- Reis, A. M. M., Araujo, S. D., Moura, R. L., Francini, R. B., Pappas, G., Coelho, A. M. A., Kruger, R. H. & Thompson, F. L. (2009).** Bacterial diversity associated with the Brazilian endemic reef coral *Mussismilia braziliensis*. *Journal of Applied Microbiology* **106**, 1378-1387.
- Renault, T., Ledeuff, R. M., Cochennec, N. & Maffart, P. (1994).** Herpes viruses associated with mortalities among pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France-comparative-study *Revue De Medecine Veterinaire* **145**, 735-742.
- Renault, T., Ledeuff, R. M., Cochennec, 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 disease in axenic larvae. *Veterinary Research* **26**, 539-543.
- Richardson, N. F., Ruesink, J. L., Naeem, S., Hacker, S. D., Tallis, H. M., Dumbauld, B. R. & Wischart, L. M. (2008).** Bacterial abundance and aerobic microbial activity across natural and oyster aquaculture habitats during summer conditions in a northeastern Pacific estuary. *Hydrobiologia* **596**, 269-278.
- Riquelme, C., Toranzo, A. E., Barja, J. L., Vergara, N. & Araya, R. (1996).** Association of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio alginolyticus* with larval mortalities of scallop (*Argopecten purpuratus*). *Journal of Invertebrate Pathology* **67**, 213-218.
- Robertson, L. A. & Kuenen, J. G. (1988).** Heterotrophic nitrification in *Thiosphaera panthotropa* - oxygen uptake and enzyme studies *Journal of General Microbiology* **134**, 857-863.
- Robertson, P. A. W., Calderon, J., Carrera, L., Stark, J. R., Zherdmant, M. & Austin, B. (1998).** Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Dis Aquat Org* **32**, 151-155.
- Romanenko, L. A., Uchino, M., Kalinovskaya, N. I. & Mikhailov, V. V. (2008).** Isolation, phylogenetic analysis and screening of marine mollusc-associated bacteria for antimicrobial, hemolytic and surface activities. *Microbiological Research* **163**, 633-644.
- Rosenberg, E. & Ben-Haim, Y. (2002).** Microbial diseases of corals and global warming. *Environ Microbiol* **4**, 318-326.

Références

- Rosenberg, E. & Falkovitz, L. (2004).** The *Vibrio shiloi/Oculina patagonica* model system of coral bleaching. *Annual Review of Microbiology* **58**, 143-159.
- Roth, M. (1971).** Fluorescence reaction for amino acids. *Anal Chem* **43**, 880-882.
- Ruby, E. G. & Asato, L. M. (1993).** Growth and flagellation of *Vibrio fischeri* during initiation of the squid lighth organ symbiosis. *Archives of Microbiology* **159**, 160-167.
- Ruby, E. G., Urbanowski, M., Campbell, J. & other authors (2005).** Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: A symbiotic bacterium with pathogenic congeners. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 3004-3009.
- Ruger, H. J., Fritze, D. & Sproer, C. (2000).** New psychrophilic and psychrotolerant *Bacillus marinus* strains from tropical and polar deep-sea sediments and emended description of the species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 1305-1313.
- S**
- Sack, D. A., Sack, R. B., Nair, G. B. & Siddique, A. K. (2004).** Cholera. *Lancet* **363**, 223-233.
- Sainz, J. C., Maeda-Martinez, A. N. & Ascencio, F. (1998).** Experimental vibriosis induction with *Vibrio alginolyticus* of larvae of the catarina scallop (*Argopecten ventricosus = circularis*) (Sowerby II, 1842). *Microb Ecol* **35**, 188-192.
- Samain, J. F., Boudry, P., Degremont, L. & other authors (2004).** Summer mortality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, overview of 3-year results of the cooperative "MOREST" Project. . *Journal of Shellfish Research* **23**, 309-310.
- Samain, J. F., Degremont, L., Soletchnik, P. & other authors (2007).** Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* **268**, 227-243.
- Samain, J. F. & McCombie, H. (2008).** Summer mortality of pacific oyster *Crassostrea gigas* The Morest project, pp. 379. Edited by Quae.
- Sass, H., Wieringa, E., Cypionka, H., Babenzien, H. D. & Overmann, J. (1998).** High genetic and physiological diversity of sulfate-reducing bacteria isolated from an oligotrophic lake sediment. *Archives of Microbiology* **170**, 243-251.
- 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. *Dis Aquat Org* **40**, 109-115.
- Sawabe, T., Oda, Y., Shiomi, Y. & Ezura, Y. (1995).** Alginate degradation by bacteria isolated from gut of sea-urchins and abalones *Microb Ecol* **30**, 193-202.

Références

- Sawabe, T., Setoguchi, N., Inoue, S., Tanaka, R., Ootsubo, M., Yoshimizu, M. & Ezura, Y. (2003). Acetic acid production of *Vibrio haliotocoli* from alginate: a possible role for establishment of abalone-*V*-haliotocoli association. *Aquaculture* **219**, 671-679.
- Schaefer, A. L., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E. & Greenberg, E. P. (1996). Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: Acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 9505-9509.
- Schmidt, A., Wehrmann, A. & Dittmann, S. (2008). Population dynamics of the invasive Pacific oyster *Crassostrea gigas* during the early stages of an outbreak in the Wadden Sea (Germany). *Helgoland Marine Research* **62**, 367-376.
- Seeligmann, C. T., Mirande, V., Tracanna, B. C., Silva, C., Aulet, O., Cecilia, M. & Binsztein, N. (2008). Phytoplankton-linked viable non-culturable *Vibrio cholerae* O1 (VNC) from rivers in Tucuman, Argentina. *J Plankton Res* **30**, 367-377.
- Seo, J. K., Crawford, J. M., Stone, K. L. & Noga, E. J. (2005). Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**, 1998-2004.
- Shao, C. P. & Hor, L. I. (2001). Regulation of metalloprotease gene expression in *Vibrio vulnificus* by a *Vibrio harveyi* LuxR homologue. *Journal of Bacteriology* **183**, 1369-1375.
- Sneath, P. H. L. (1957). The application of computers to taxonomy. *Journal of general Microbiology* **17**, 201-226.
- Soletchnik, P., Gouletquer, P., Heral, M., Razet, D. & Geairon, P. (1996a). Evaluation of the energetic budget of rite Japanese oyster, *Crassostrea gigas*, in Marennes-Oleron Bay. *Aquatic Living Resources* **9**, 65-73.
- Soletchnik, P., Gouletquer, P., Héral, M., Razet, D. & Geairon, P. (1996b). evaluation du bilan énergétique de l'huître creuse *Crassostrea gigas* en baie de Marennes-Oléron (France). *Aquatic Living Resources* **9**, 65-73.
- Soletchnik, P., Le Moine, O., Faury, N., Razet, D., Geairon, P. & Gouletquer, P. (1999). Summer mortality of the oyster in the Bay Marennes-Oleron: Spatial variability of environment and biology using a geographical information system (GIS). *Aquatic Living Resources* **12**, 131-143.
- Song, Y. L., Cheng, W. & Wang, C. H. (1993). Isolation and characterisation of *Vibrio damsela* infectious for cultured shrimp in Taiwan *Journal of Invertebrate Pathology* **61**, 24-31.
- Sornin, J. (1984). Rôle et conséquences de la biodéposition à l'interface eau/sédiment. *J Rech Oceanogr* **9**, 38 - 40.
- Sornin, J. M., Collos, Y., Delmas, D., Feuilletgirard, M. & Gouleau, D. (1990). Nitrogenous nutrient transfers in oyster ponds: Role of sediment in deferred primary production. *Mar Ecol-Prog Ser* **68**, 15-22.

Références

Soto, W., Gutierrez, J., Remmenga, M. D. & Nishiguchi, M. K. (2009). Salinity and Temperature Effects on Physiological Responses of *Vibrio fischeri* from Diverse Ecological Niches. *Microb Ecol* **57**, 140-150.

Stevenson, L. H. (1978). Case for bacterial dormancy in aquatic systems *Microb Ecol* **4**, 127-133.

Sugumar, G., Nakai, T., Hirata, Y., Matsubara, D. & Muroga, K. (1998). *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis Aquat Org* **33**, 111-118.

Sun, F. R., Chen, J. X., Zhong, L. H., Zhang, X. H., Wang, R., Guo, Q. R. & Dong, Y. (2008). Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*. *FEMS Microbiol Ecol* **64**, 37-44.

T

Tabacchioni, S., Ferri, L., Manno, G. & other authors (2008). Use of the *gyrB* gene to discriminate among species of the *Burkholderia cepacia* complex. *FEMS Microbiol Lett* **281**, 175-182.

Takahashi, K. G., 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.

Tall, B. D., Fall, S., Pereira, M. R. & other authors (2003). Characterization of *Vibrio* fluvialis-like strains implicated in limp lobster disease. *Appl Environ Microbiol* **69**, 7435-7446.

Tamplin, M. L., Gauzens, A. L., Huq, A., Sack, D. A. & Colwell, R. R. (1990). Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters *Appl Environ Microbiol* **56**, 1977-1980.

Tanaka, R., Ootsubo, M., Sawabe, T., Tajima, K., Vandenberghe, J. & Ezura, Y. (2002). Identification of *Vibrio halioticoli* by colony hybridization with non-radioisotope labeled genomic DNA probe. *Fisheries Science* **68**, 227-229.

Tanaka, R., Sugimura, I., Sawabe, T., Yoshimizu, M. & Ezura, Y. (2003). Gut microflora of abalone *Haliotis discus hannai* in culture changes coincident with a change in diet. *Fisheries Science* **69**, 951-958.

Tannock, G. W. (2002). Molecular methods for exploring the intestinal ecosystem. *Br J Nutr* **87**, S199-S201.

Tantillo, G. M., Fontanarosa, M., Di Pinto, A. & Musti, M. (2004). Updated perspectives on emerging vibrios associated with human infections. *Letters in Applied Microbiology* **39**, 117-126.

Taylor, D. E. & Hiratsuka, K. (1990). Use of non-radioactive DNA probes for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in stool specimens. *Molecular and Cellular Probes* **4**, 261-271.

Références

- Tebbe, C. C. & Vahjen, W. (1993).** Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant-DNA from bacteria and yeast **59**, 2657-2665.
- Thompson, F. L., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K. & Swings, J. (2001).** Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Syst Appl Microbiol* **24**, 520-538.
- Thompson, F. L., Iida, T. & Swings, J. (2004a).** Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**, 403-+.
- Thompson, J. R., Randa, M. A., Marcelino, L. A., Tomita-Mitchell, A., Lim, E. & Polz, M. F. (2004b).** Diversity and dynamics of a north Atlantic coastal *Vibrio* community. *Appl Environ Microbiol* **70**, 4103-4110.
- Tirape, A., Bacque, C., Brizard, R., Vandenbulcke, F. & Boulo, V. (2007).** Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Developmental and Comparative Immunology* **31**, 859-873.
- Tison, D. L. & Seidler, R. J. (1983a).** *Vibrio aestuarianus* - A new species from estuarine waters and shellfish. *Int J Syst Bacteriol* **33**, 699-702.
- Tison, D. L. & Seidler, R. J. (1983b).** *Vibrio aestuarianus* - a new species from estuarine waters and shellfish *Int J Syst Bacteriol* **33**, 699-702.
- Tolker-Nielsen, T., Holmstrom, K., Boe, L. & Molin, S. (1998).** Non-genetic population heterogeneity studied by in situ polymerase chain reaction. *Molecular Microbiology* **27**, 1099-1105.
- Tubiash, H. S., Chanley, P. E. & Leifson, E. (1965).** Bacillary necrosis, a disease of Larval and Juvenile Bivalves Molluks. I. Etiology and Epizootiology. *Journal of Bacteriology* **90**, 1036-1044.
- Tubiash, H. S., Colwell, R. R. & Sakazaki, R. (1970).** Marine Vibrios Associated with Bacillary Necrosis, a disease of Larval and Juvenile Bivalves Mollusks. *Journal of Bacteriology* **103**, 271-272.
- Tubiash, H. S. (1974).** single and continuous exposure of adult American oyster, *Crassostrea virginica*, to marine *Vibrios*. *Can J Microbiol* **20**, 513-517.
- Tunkijjanukij, S., Giaever, H., Chin, C. C. Q. & Olafsen, J. A. (1998).** Sialic acid in hemolymph and affinity purified lectins from two marine bivalves. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **119**, 705-713.
- Turner, K., Porter, J., Pickup, R. & Edwards, C. (2000).** Changes in viability and macromolecular content of long-term batch cultures of *Salmonella typhimurium* measured by flow cytometry. *J Appl Microbiol* **89**, 90-99.

U

- Uroz, S., Dessaux, Y. & Oger, P. (2009).** Quorum Sensing and Quorum Quenching: The Yin and Yang of Bacterial Communication. *Chembiochem* **10**, 205-216.

Références

V

- Van Rijn, J., Tal, Y. & Schreier, H. J. (2006).** Denitrification in recirculating systems: Theory and applications. *Aquacultural Engineering* **34**, 364-376.
- Van Sprang, P. A., Vangheluwe, M. L. & Janssen, C. R. (2000).** The toxicity identification of inorganic toxicants in real world samples. In *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*, pp. 459-466. Edited by G. Personne & C. Janssen. New York: Kluwer Academic/Plenum Publ.
- Vasta, G. R., Cheng, T. C. & Marchalonis, J. J. (1984).** A lectin on the hemocyte membrane of the oyster (*Crassostrea virginica*) *Cellular Immunology* **88**, 475-488.
- Venkateswaran, K., Dohmoto, N. & Harayama, S. (1998).** Cloning and nucleotide sequence of the gyrB gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 681-687.
- Vezzulli, L., Chelossi, E., Riccardi, G. & Fabiano, M. (2002).** Bacterial community structure and activity in fish farm sediments of the Ligurian sea (Western Mediterranean). *Aquaculture International* **10**, 123-141.
- Vezzulli, L., Pezzati, E., Repetto, B., Stauder, M., Giusto, G. & Pruzzo, C. (2008).** A general role for surface membrane proteins in attachment to chitin particles and copepods of environmental and clinical vibrios. *Letters in Applied Microbiology* **46**, 119-125.
- Visick, K. L. & Ruby, E. G. (2006).** *Vibrio fischeri* and its host: it takes two to tango. *Current Opinion in Microbiology* **9**, 632-638.

W

- Waechter, M., Le Roux, F., Nicolas, J. L., Marissal, E. & Berthe, F. (2002).** Characterisation of *Crassostrea gigas* spat pathogenic bacteria. *Comptes Rendus Biologies* **325**, 231-238.
- Wang, F. & Chapman, P. (1999).** Biological implications of sulfide in sediment – a review focusing on sediment toxicity. *Environ Toxicol Chem* **18**, 2526-2532.
- Wang, N., Ingersoll, C. G., Greer, I. E. & other authors (2007).** Chronic toxicity of copper and ammonia to juvenile freshwater mussels (Unionidae). *Environmental Toxicology and Chemistry* **26**, 2048-2056.
- Ward, J. R., Bruno, J., Harvell, C. D., Mullen, K., Petes, L. E., Rypien, K. L., Sanchez, J. & Smith, G. (2003).** Patterns of coral diversity and disease in the Caribbean. *Integrative and Comparative Biology* **43**, 820-820.
- Watnick, P. I., Fullner, K. J. & Kolter, R. (1999).** A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *Journal of Bacteriology* **181**, 3606-3609.

Références

- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J. (1991).** 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* **173**, 697-703.
- West, P. A. & Lee, J. V. (1982).** Ecology of *Vibrio* species, including *Vibrio cholerae*, in natural waters of Kent, England *Journal of Applied Bacteriology* **52**, 435-448.
- Whitesides, M. D. & Oliver, J. D. (1997).** Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microbiol* **63**, 1002-1005.
- Woese, C. R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* **51**, 221-271.
- Wollenberg, M. S. & Ruby, E. G. (2009).** Population Structure of *Vibrio fischeri* within the Light Organs of Euprymna scolopes Squid from Two Oahu (Hawaii) Populations. *Appl Environ Microbiol* **75**, 193-202.
- Woodland, D. J., Cabanban, A. S., Taylor, V. M. & Taylor, R. J. (2001).** A synchronized rhythmic flashing light display by schooling Leiognathus splendens (Leiognathidae : Perciformes). In *6th Indo-Pacific Fish Conference*, pp. 159-162. Durban, South Africa.
- Wright, A. C., Guo, Y. F., Johnson, J. A., Nataro, J. P. & Morris, J. G. (1992).** Development and testing of non-radioactive DNA oligonucleotide probe that is specific for *Vibrio cholerae* cholera-toxin *Journal of Clinical Microbiology* **30**, 2302-2306.
- Wright, A. C., Miceli, G. A., Landry, W. L., Christy, J. B., Watkins, W. D. & Morris, J. G. (1993).** Rapid identification of *Vibrio Vulnificus* on non selective media with an alkaline phosphatase-labeled oligonucleotide probe. *Appl Environ Microbiol* **59**, 541-546.
- Wright, A. C., Hill, R. T., Johnson, J. A., Roghman, M. C., Colwell, R. R. & Morris, J. G. (1996).** Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol* **62**, 717-724.

X

- Xu, H. S., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J. & Colwell, R. R. (1982).** Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment *Microb Ecol* **8**, 313-323.

Y

- 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.
- Yamamoto, S. & Harayama, S. (1996).** Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 506-511.

Références

Yamamoto, S. & Harayama, S. (1998). Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of gyrB, ropD and 16S rRNA genes. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 813-819.

Yamamoto, S., Bouvet, P. J. M. & Harayama, S. (1999). Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on gyrB sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 87-95.

Yoh, M., Miyagi, K., Matsumoto, Y., Hayashi, K., Takarada, Y., Yamamoto, K. & Honda, T. (1993). Development of an enzyme-labeled oligonucleotide probe for the cholera-toxin gene. *J Clin Microbiol* **31**, 1312-1314.

Yoon, W. B. & Rosson, R. A. (1990). Improved method of enumeration of attached bacteria for study of fluctuation in the abundance of attached and free-living bacteria in response to diel variation in seawater turbidity *Appl Environ Microbiol* **56**, 595-600.

Z

Zhong, L., Chen, J., Zhang, X. H. & Jiang, Y. A. (2009). Entry of *Vibrio cincinnatiensis* into viable but nonculturable state and its resuscitation. *Letters in Applied Microbiology* **48**, 247-252.

Zhou, J. Z., Bruns, M. A. & Tiedje, J. M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* **62**, 316-322.

Zhu, J. & Mekalanos, J. J. (2003). Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*. *Developmental Cell* **5**, 647-656.

Ziebis, W., Huettel, M., Forster, S., (1996). Impact of biogenic sediment topography on oxygen fluxes in permeable sediments ; Marine Ecology Progress Series, Vol 140 :22

RESUME

Depuis plusieurs années, l'ostréiculture française doit faire face à de fortes mortalités qui touchent les juvéniles et parfois les adultes de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Les études réalisées dans le cadre d'un projet multidisciplinaire (MOREST) ont montré que les mortalités survenaient suite à l'interaction de plusieurs facteurs à savoir, l'état physiologique de l'huître et ses caractéristiques génétiques, des pathogènes parmi lesquels des bactéries du genre *Vibrio*, et l'environnement dont la température et le sédiment. Le rôle du sédiment a été suggéré du fait de la concomitance entre les mortalités, et l'augmentation des composés toxiques comme l'ammonium et les sulfures dans le sédiment. Par ailleurs, il pouvait constituer un réservoir de vibrions selon des études précédentes.

Pour vérifier ces hypothèses les caractéristiques physico-chimiques, la structure des communautés bactériennes ainsi que l'abondance de *V. aestuarianus*, pathogène de *C. gigas* ont été déterminées dans les sédiments sous tables et hors tables des sites situés dans l'aber Benoît et en rivière d'Auray pendant 2 années.

Ce travail a confirmé l'existence d'un risque sédimentaire par la présence de fortes concentrations d'ammonium et de sulfures dans les sédiments à certaines périodes de l'année ainsi que l'influence des huîtres sur leur intensité. Cependant, l'impact des tables ostréicoles sur ces flux n'est évident que dans l'aber Benoît. Il a mis en évidence une certaine stabilité de la structure et de la diversité des microflores des sédiments au regard des nombreuses influences qu'elles subissent, spécialement dans l'aber Benoît. La microflore des sédiments de la rivière d'Auray semble quant à elle plus dynamique et influencée par les apports extérieurs. Ces résultats prouvent l'importance des caractéristiques liées aux sites dans la réponse des communautés bactériennes face des modifications du milieu.

La population de *Vibrio* est apparue peu diversifiée et peu abondante fluctuant avec la température comme les autres groupes bactériens. Deux espèces pathogènes semblent pourtant faire partie de la communauté dominante des sédiments à savoir *V. ordalii* et *V. aestuarianus*. L'étude de l'écologie de ce dernier a montré qu'il est présent dans le sédiment pendant les saisons froide et chaude alors que sa détection dans les huîtres est plutôt occasionnelle. Des expérimentations en microcosmes avec la souche 02/041 transformée par un plasmide codant pour la GFP ont montré que cette bactérie pouvait circuler aisément entre le sédiment, l'eau de mer et les huîtres et provoquer des mortalités. Nos résultats mettent ainsi en évidence le rôle du sédiment en tant que réservoir de *V. aestuarianus*.

Mots clés : Huître, *Crassostrea gigas*, bactéries, *Vibrio aestuarianus*, écologie, sédiment, ammonium, sulfures.