

UNIVERSITE BLAISE PASCAL-CLERMONT FERRAND

UFR Sciences Exactes et Naturelles

IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADE

66522
OLR 1374
E700-MAG-P

PHYLOGENIE MOLECULAIRE DE BACTERIES PATHOGENES DE BIVALVES

MARINS, *VIBRIO SPLENDIDUS*, A PARTIR DU GENE *GYRB*

Mémoire de stage de maîtrise biologie cellulaire et physiologie

option : physiologie microbienne

Mémoire présenté, par Fabien MAGNE,
le 10 septembre 2001.

IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 01374

The logo for Ifremer, featuring a stylized grey fish silhouette above the word "Ifremer" in a bold, black, sans-serif font, all contained within a yellow rectangular background.

Laboratoire génétique et pathologie
IFREMER La Tremblade
17390 Ronce Les bains

Je souhaite exprimer ma reconnaissance à Monsieur André GERARD, responsable de la station IFREMER de la Tremblade, pour m'avoir permis d'effectuer mon stage au sein du laboratoire de génétique et de pathologie.

Je tiens à remercier tout particulièrement Frédérique Le Roux pour m'avoir encadré tout au long de ce stage. Durant toutes ces semaines, j'ai bénéficié de son enseignement qui m'a beaucoup apporté. Merci encore pour son aide et sa confiance.

Je remercie Mélanie pour son aide, ses conseils et sa gentillesse.

Merci aux thésards, Corinne, Isabelle et Lionel, pour leur bonne humeur et leur sympathie.

Merci à Maeva, Bruno, et les stagiaires avec lesquels j'ai passé de bons moments.

Sommaire

PRESENTATION DE L'IFREMER.....	2
INTRODUCTION	5
I. MATERIELS ET METHODES	10
I.1. COLLECTION DE SOUCHES DE <i>VIBRIO SPLENDIDUS</i>	10
I.2. RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (PCR).....	10
I.3. CLONAGE	13
I.3.1. <i>Ligation</i>	13
I.3.2. <i>Transformation</i>	13
I.3.3. <i>Sélection des colonies blanches-bleues</i>	13
I.3.4. <i>Sélection par PCR</i>	13
I.4. MINIPRÉPARATIONS D'ADN PLASMIDIQUE.....	14
I.4.1. <i>Culture des bactéries</i>	14
I.4.2. <i>Lyse alcaline</i>	14
I.4.3. <i>Extraction de l'ADN plasmidique</i>	14
I.4.4. <i>Contrôle de l'ADN plasmidique</i>	15
I.5. SÉQUENÇAGE	15
I.6. DIGESTION PAR DES ENZYMES DE RESTRICTION.....	16
II. RESULTATS	18
II.1. POLYMORPHISME ENTRE COPIES DU GÈNE 16S.....	18
II.2. AMPLIFICATION DU GÈNE DE LA GYRASE PAR PCR.....	18
II.3. PCR AVEC SP6 ET T7	18
II.4. DIGESTION DES MINIPRÉPARATIONS D'ADN PLASMIDIQUE.....	20
II.5. ALIGNEMENT ET PHYLOGÉNIE.....	20
II.6. CARTE DE RESTRICTION ET OUTILS SPÉCIFIQUES	20
II.7. ANALYSE DE LA PCR RFLP DU GÈNE <i>GYRB</i>	21
III. DISCUSSION.....	23
IV. CONCLUSION.....	25
BIBLIOGRAPHIE	26

Présentation de l'IFREMER

Présentation générale de l'institut

Etablissement public à caractère industriel et commercial, l'IFREMER, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER, est le seul organisme français à vocation entièrement maritime. Créé par un décret du 5 juin 1984, il résulte de la fusion du Centre National d'Exploitation pour les Océans (CNEXO) et de l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes (ISTPM).

L'IFREMER est placé sous la tutelle conjointe des ministères de la Recherche, de l'Agriculture et de la Pêche, de l'Équipement, des Transports et du Logement. Le siège social se situe à Issy-les-Moulineaux.

L'IFREMER en quelques chiffres, c'est :

- ✓ Un budget annuel de près d'un milliard de francs (150 millions d'Euros),
- ✓ 1700 cadres, chercheurs, ingénieurs, marins, techniciens et administratifs,
- ✓ 27 implantations (centres ou stations) réparties sur tout le littoral métropolitain et dans les DOM-TOM,
- ✓ 72 laboratoires ou services de recherche.

Ses missions

L'institut s'est vu confier, par le gouvernement, une mission très large de recherche et de développement technologique pour la connaissance de l'océan et l'exploitation des ressources marines. Les missions de l'IFREMER sont :

- ✓ Connaître, évaluer, prévoir l'évolution des ressources des océans et permettre leur exploitation durable,

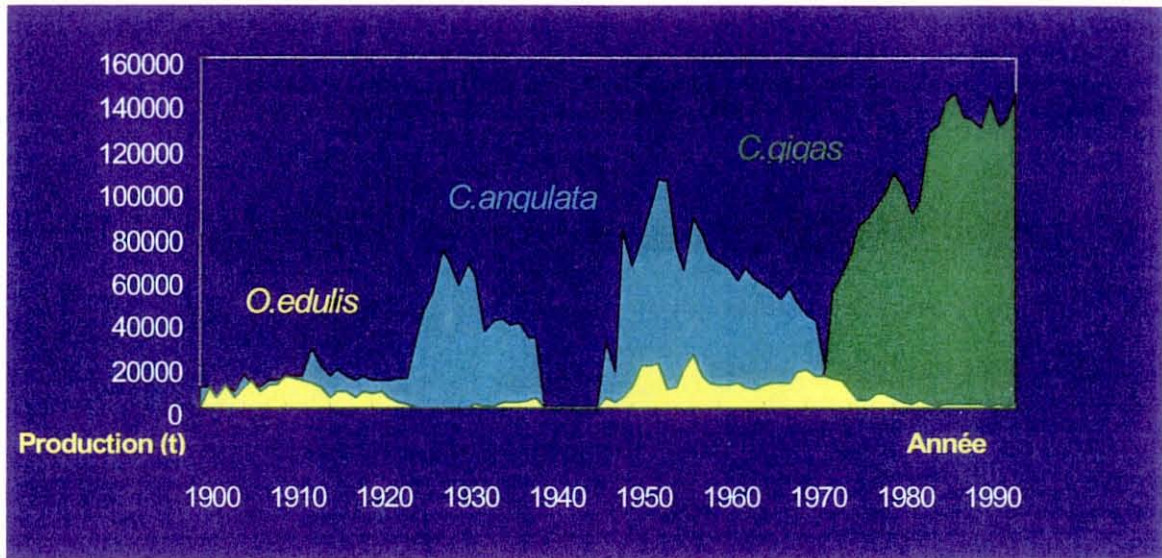
- ✓ Améliorer les méthodes de surveillance, de prévision, d'évolution, de protection et de mise en valeur du milieu marin et côtier,
- ✓ Favoriser le développement socio-économique du monde maritime,
- ✓ Avoir un rôle de service public (aide à la décision), de conseil et d'expertise auprès de l'Etat, des collectivités territoriales, des milieux professionnels de la mer (marins, pêcheurs, aquaculteurs), et aussi des industriels de la transformation et de la valorisation des ressources marines.

Présentation de la station de La Tremblade

Située au cœur du bassin ostréicole de Marennes-Oléron, la station de La Tremblade est spécialisée dans les domaines de la conchyliculture et de la surveillance de l'environnement littoral.

Sa compétence géographique pour l'environnement littoral s'étend de la rive gauche de la Charente à la Gironde. Dans le domaine conchylicole, ses compétences s'étendent sur l'ensemble des pertuis charentais, depuis le sud de la Vendée jusqu'à l'estuaire de la Gironde. En génétique et pathologie, ses compétences sont reconnues au niveau national et international.

Figure 1 : Production ostréicole en France depuis le début du siècle



Phylogénie moléculaire de bactéries pathogènes de bivalves marins, *Vibrio splendidus*, à partir du gène *GyrB*

INTRODUCTION

La France est le premier producteur européen d'huîtres et parmi les trois premiers producteurs de moules (pêche et aquaculture réunies). L'ostréiculture, basée presque exclusivement sur la monoculture de l'huître creuse, reste fortement dépendante des risques de maladies. En effet, ce secteur de l'aquaculture a connu une succession d'épizooties qui ont touché les différentes espèces d'huîtres élevées sur les côtes françaises (Figure 1). L'huître plate, *Ostrea edulis*, a subi une forte baisse de sa production de 15000 à 1500 tonnes/an à partir des années 1970 suite à 2 épizooties successives par les protozoaires, *Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae* (Grizel et al., 1974 ; Pichot et al., 1980). L'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, a disparu du littoral français au début des années 1970 suite à une infection virale à Iridovirus (Comps et Duthoit, 1975). Jusqu'à présent, le seul recours face à une épizootie a été l'introduction de nouvelles espèces d'huîtres. Ainsi, l'huître creuse *Crassostrea gigas* a été introduite pour permettre le maintien de l'ostréiculture en France et représente également 98% de la production mondiale d'huîtres.

Les traitements ne sont pas envisageables en milieu ouvert en raison des quantités de substances à utiliser et de l'accumulation de résidus dans le milieu. Il en est de même pour la vaccination puisque les mollusques ne développent pas de mécanismes de défense spécifiques tels que l'immunité humorale. Le seul moyen de lutte contre les maladies infectieuses chez ces animaux reste donc l'identification des pathogènes, la mise au point d'outils de détection spécifiques et sensibles et la gestion de risques : contrôle et suivi de la présence de pathogènes, réduction de l'expansion et de la virulence par de nouvelles pratiques zootechniques.

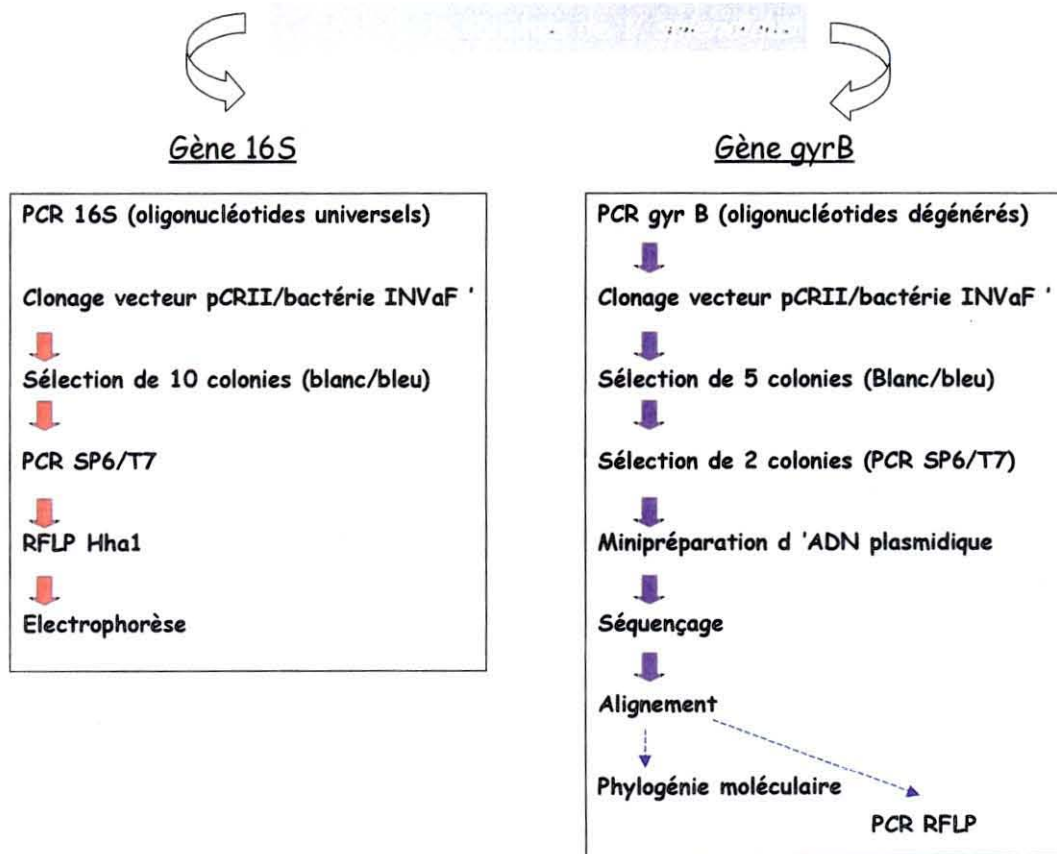
est utilisé couramment en phylogénie moléculaire (Urakawa et al., 1997). Ainsi, au laboratoire IFREMER de la Tremblade, l'identification moléculaire d'une souche pathogène du naissain de *C. gigas* (sp7) a montré clairement son appartenance au groupe *V. splendidus* biovar II (Waechter et al., soumis) (Figure 2, souche sp6). L'arbre phylogénique obtenu a permis de suggérer que les *V. splendidus* biovar II appartenait à une espèce distincte de *V. splendidus* biovar I (Figure 2, biovar I, sp5 ; biovar II, sp6 et sp7). Afin de confirmer ce résultat, Le Roux et al. ont étudié la taxonomie d'une collection de *V. splendidus* (tableau I) après clonage et séquençage du gène 16S (Figure 3). La séparation en 2 taxons de biovar I et II a été confirmée. Par contre dans le cas de *V. splendidus* biovar I, il semble exister un polymorphisme entre les différentes copies du gène 16S pour une même souche isolée (Figure 3, clone a et b de sp2, sp3 et sp5). Le polymorphisme entre différentes copies du gène dans une même souche apparaît équivalent au polymorphisme du gène entre souches et rend impossible la discrimination des bactéries dans le groupe biovar I et donc la mise au point d'outils spécifiques.

Le but de ce travail a été d'étudier la taxonomie des souches *V. splendidus* après clonage et séquençage d'un autre gène d'intérêt phylogénétique : le gène *gyrB*. Ce gène code pour la sous unité B de la gyrase, une topoisomérase de type II permettant le déroulement de l'ADN pendant la réplication. Ce gène présente l'intérêt (Venkateswaran et al., 1998) :

- d'être en copie unique dans le génome bactérien
- d'évoluer plus vite que les gènes ribosomiques soit donc de permettre une discrimination intra-spécifique de souches
- de ne pas être transmis horizontalement par un plasmide

Les différentes étapes de ce travail sont schématisées figure 4

Figure 4 : Les différentes étapes de ce travail



I. MATERIELS ET METHODES

I.1. Collection de souches de *Vibrio splendidus*

13 souches de *Vibrio splendidus* associées à des mortalités d'animaux marins ont été sélectionnées pour notre étude (Tableau 1).

Souche	Nom	Origine	Pathogénicité
1	VC1	Coquille	-
2	A053	Coquille	-
3	A515	Coquille	-
4	VS6 turb	Turbot	-
5	CRL40	Référence	-
6	CRL39	Référence	-
7	TNEMF6	Huître creuse	+
8	TNNII7	Huître creuse	-
9	PeTF6	Huître creuse	+
10	LT06	Coquille	-
11	PMV19	Coquille	+
12	PM50	Coquille	-
13	PMV18	Coquille	-

Tableau 1 : collection de *V. splendidus* utilisées pour notre étude, numéro de souche, nom, origine et pathogénicité sur larves ou naissain d'huître creuse.

I.2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La technique de PCR est utilisée pour amplifier spécifiquement et de façon exponentielle un segment d'acide nucléique situé entre 2 séquences connues (Saiki et al., 1985). Une colonie bactérienne ou 100 ng d'ADN est ajouté à un mélange réactionnel contenant le tampon de l'enzyme, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM d'un mélange de désoxyribonucléotides

(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1 μ M de chaque oligonucléotide (Tableau 2) et 2.5 U de Taq DNA polymérase (silverstar, eurogentec). La réaction PCR est effectuée par un thermocycleur programmé comme suit (MJ research):

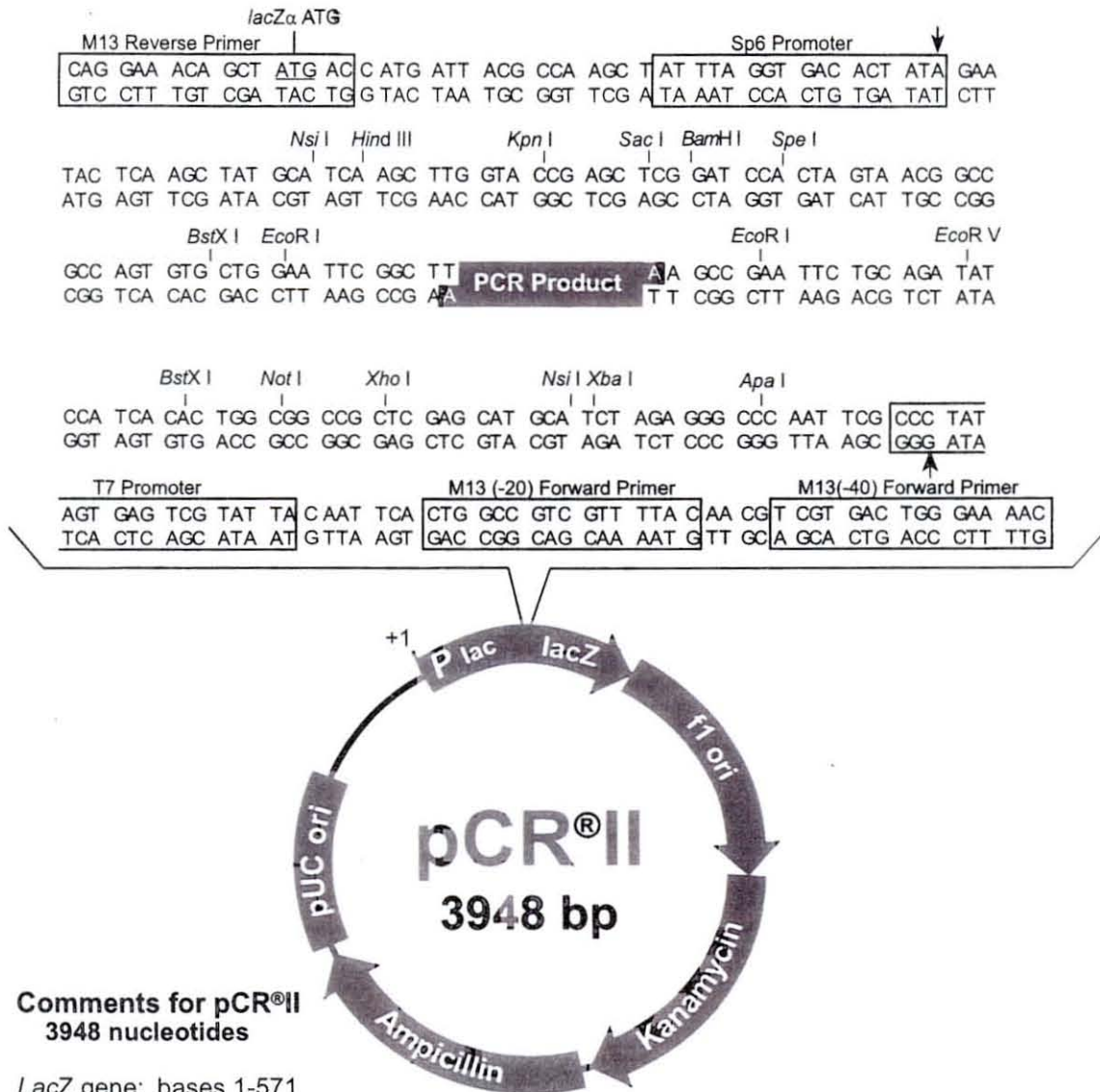
- Une étape de dénaturation, 3 min à 94°C
- 30 cycles de 3 étapes : 1) 94°C 1 min 2) hybridation des amorces dont la température dépend de la séquence des amorces 3) élongation à 72°C dont le temps dépend de la longueur du fragment
- Une étape d'élongation terminale de 10 min à 72°C

L'amplification est contrôlée après migration électrophorétique en gel d'agarose 1% dans du tampon TAE, coloration par l'agent intercalant bromure d'éthidium et visualisation des acides nucléiques aux UV.

Amorces	Type d'amplification	Température d'hybridation des amorces (°C)	Durée d'élongation (min)
Br 1 / Br 2	ADNr 16S	50	1 min 30 s
UP 1 / UPr 2	<i>gyrB</i> , (1000 pb)	58	2 min
SP 6 / T 7	Insert	50	2 min
Gyr S / Gyr AS	<i>gyrB</i> (620 pb)	56	45 s

Tableau 2 : Paramètres PCR (température d'hybridation, temps d'élongation) pour les différentes amorces utilisées.

Figure 5 : Carte du plasmide pCRII.



Comments for pCR®II
3948 nucleotides

- LacZ gene: bases 1-571
- Sp6 promoter: bases 239-255
- Multiple Cloning Site: bases 269-381
- TA Cloning® site: bases 335-336
- T7 promoter: bases 388-407
- F1 origin: bases 572-986
- Kanamycin resistance: bases 987-2114
- Ampicillin resistance: bases 2133-2992
- pUC origin (pMB1-derived): bases 3182-3765

I.3. Clonage

I.3.1. Ligation

Le fragment amplifié par PCR est inséré dans le vecteur pCRII (TA cloning kit, In vitrogen) par ligation entre deux thymines du plasmide et deux adénosines de l'insert (cette Taq polymérase a la particularité de rajouter un A aux extrémités 3' des fragments amplifiés) (Figure 5). Environ 20 ng de produit PCR sont ajoutés au mélange réactionnel contenant le tampon de l'enzyme, 50 ng de vecteur et 4 U de T4 DNA Ligase. Le mélange est incubé une nuit à 14°C.

I.3.2. Transformation

Les bactéries compétentes INVaF' sont transformées par le plasmide suite à un choc thermique. Pour cela, 2 µl de produit de ligation sont ajoutés aux bactéries compétentes. Le mélange est incubé 30 min sur glace. Après un choc thermique de 30 secondes à 42°C, 250 µl de milieu nutritif sans antibiotique (milieu SOC) sont ajoutés. Les bactéries sont incubées à 37°C sous agitation pendant 1 heure puis étalées sur boîte de gélose LB/agar supplémentée en ampicilline (50 µg/ml). Après une nuit de culture à 37°C, les bactéries exprimant le gène de résistance à l'antibiotique via le plasmide sont sélectionnées.

I.3.3. Sélection des colonies blanches-bleues

Les bactéries contenant l'insert sont sélectionnées grâce à la présence du gène *Lac Z* codant pour l'enzyme β galactosidase au niveau du site d'insertion. Le substrat X Gal, ajouté à la gélose, réduit par la β galactosidase donne une coloration bleue. L'absence de coloration bleue des colonies cultivées témoigne de la présence de l'insert dans le vecteur plasmidique.

I.3.4. Sélection par PCR

Afin de vérifier la taille de l'insert, des colonies blanches sont soumises à une PCR avec les amorces SP6 et T7 encadrant l'insert dans le plasmide.

10000 rpm, le culot est lavé par 500 µl d'éthanol à 70° et séché. Les acides nucléiques sont remis en suspension dans 20 µl de tampon TE, puis stockés à -20°C.

I.4.4. Contrôle de l'ADN plasmidique

La spectrophotométrie permet de contrôler qualitativement et quantitativement la préparation d'ADN. La densité optique (DO) à 260 nm mesure la quantité d'acide nucléique et la DO à 280 nm mesure la quantité de protéines. La contamination en protéines est mesurée par le rapport DO 260 / DO 280 qui doit être voisin de 1,7. L'ADN plasmidique est aussi contrôlé par migration électrophorétique en gel d'agarose à 1% dans du TAE.

I.5. Séquençage

Les mini-préparations d'ADN plasmidique obtenues sont utilisées pour l'analyse de l'insert par la méthode de séquençage multiplex d'ADN double brin avec des primers marqués et l'enzyme sequiterm excell II (épicerentre) préconisée pour l'utilisation du séquenceur disponible au laboratoire (Licor). Le principe de cette technique repose 1) sur le séquençage enzymatique décrit par Sanger en 1977, 2) sur la technique de PCR asymétrique :

1) élongation à partir d'une amorce d'un ADN complémentaire à une matrice par une ADN polymérase ; terminaison aléatoire de la chaîne néosynthétisée par des didéoxyribonucléotides. Ici deux amorces (sens et antisens) encadrant le fragment à séquencer sont utilisées en même temps. L'une des amorces est marquée par un fluorochrome absorbant à 700 nm, l'autre à 800 nm. Le laser du séquenceur active simultanément les deux fluorochromes et permet ainsi la lecture de la séquence à partir des deux amorces, soit dans les deux sens.

2) Une série de 30 cycles de dénaturation, hybridation des amorces et élongation permet d'amplifier le signal.

En pratique 500 ng de plasmide sont ajoutés à un mélange réactionnel contenant 1 picomole de chaque amorce, le tampon de l'enzyme et 5 unités d'Excell II DNA polymérase. Ce mélange est réparti dans 4 tubes contenant les didéoxyribonucléotides ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP. Le mélange est incubé 2 minutes à 92°C suivi de 30 cycles de 30 secondes à 92°C, 30 secondes à 50°C et 1 minute à 70 °C. A la fin de la réaction, une solution d'arrêt est ajoutée aux échantillons. Après une dénaturation de 3 minutes à 92°C, les échantillons sont déposés dans un gel d'acrylamide-urée dénaturant à 5.5% pour la séparation des fragments nucléotide par nucléotide.

Les séquences obtenues sont comparées par le programme d'alignement multiple *Clustal W* disponible sur internet (site infobiogen) et une analyse phylogénétique a été réalisée en utilisant la méthode de Neighbour-joining.

I.6. Digestion par des enzymes de restriction

Environ 100 ng de produit de PCR ou 500 ng de plasmide sont digérés par 3 unités d'enzyme de restriction, *HhaI*, *EcoRI* et *TaqI*, à 37 °C ou 65 °C. La taille des fragments est analysée après migration électrophorétique en gel d'agarose à 2%/TAE.

Figure 6 : Migration électrophorétique des fragments de restriction obtenus par digestion par l'enzyme *HhaI* des produits de PCR amplifiés avec les amorces SP6/T7 à partir de 3 colonies transformées par pCRII dans lequel le gène 16S de la souche sp3 a été inséré.

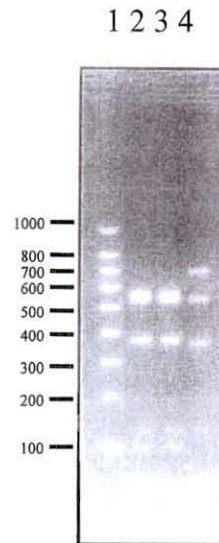
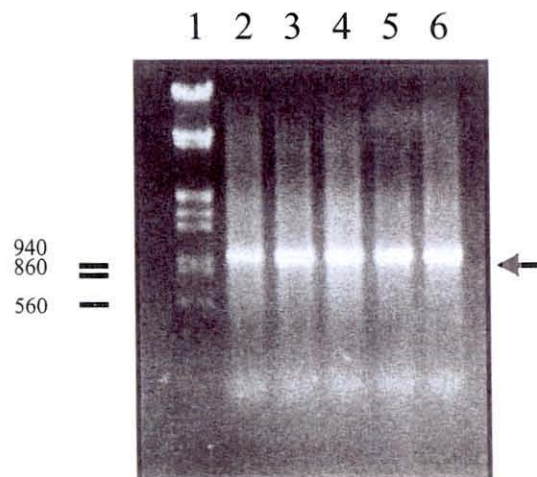


Figure 7 : Migration électrophorétique des fragments amplifiés par PCR avec les amorces dégénérées UP1 et UPr2 du gène *gyrB* des souches sp1, 2, 3, 5, 6 de *V. splendidus*.



II. RESULTATS

II.1. Polymorphisme entre copies du gène 16S

Dans un travail précédent, Le Roux et al. ont suggéré l'existence d'un polymorphisme entre différentes copies du gène 16S pour les souches sp2, 3 et 5 (Figure 3 ; tableau 1). Ce polymorphisme impliquerait un site de restriction *HhaI*. Le gène 16S de ces souches a été cloné après amplification par PCR à l'aide d'amorces universelles. Une dizaine de colonies ont été prélevées pour l'analyse par PCR-RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism) de l'insert. Un exemple de résultats est présenté figure 6. Pour toutes les souches étudiées deux types de profils ont été obtenus : **a)** 570, 530, 350, 140 et 110 pb (lignes 2 et 3) **b)** 680, 530, 350, 140 pb (ligne 4).

II.2. Amplification du gène de la gyrase par PCR

Le gène *gyrB* des 13 souches de *Vibrio splendidus* été amplifié par PCR à l'aide d'oligonucléotides dégénérés à partir d'ADN. Le contrôle d'amplification sur gel nous indique une taille d'environ 1 000 pb du produit PCR ce qui correspond à la taille attendue (Figure 7).

II.3. PCR avec SP6 et T7

Afin de vérifier la taille du produit inséré dans le plasmide pCRII, une PCR est réalisée sur les colonies blanches avec les amorces SP6 et T7. Ces primers s'hybrident spécifiquement au niveau du plasmide de part et d'autre de l'insert. Deux types de produits de PCR sont obtenus : **a)** un fragment de 1300 pb correspondant à l'insert plus les régions flanquantes entre SP6 et T7 (ligne 2, 3, 5, 6, 7) **b)** un fragment de 300 bp correspondant au fragment SP6/T7 sans insert (figure 8).

Figure 8 : Migration électrophorétique des produits de PCR amplifiés avec les amorces SP6/T7 à partir de 6 colonies transformées par pCRII dans lequel le gène *gyrB* de la souche sp3 a été inséré.

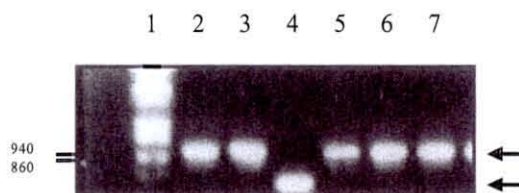
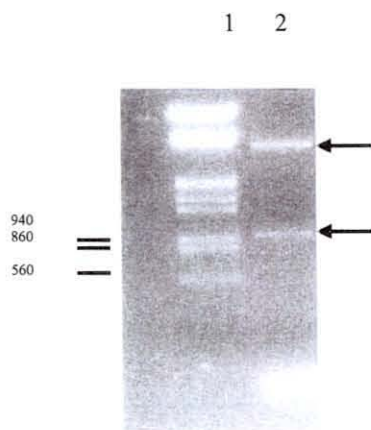


Figure 9 : Migration électrophorétique des produits de digestion par *EcoR*I d'une minipréparation d'ADN plasmidique pour le clonage du gène *gyrB* de la souche sp3.



II.4. Digestion des minipréparations d'ADN plasmidique

Pour vérifier l'insertion, mais aussi la qualité et la quantité de plasmide, les ADN plasmidiques, sont digérés par *EcoRI*. Les sites de restriction pour cette enzyme sont situés de part et d'autre de l'insert dans le plasmide. Dans tous les cas deux bandes sont observées sur le gel : une première bande correspondant à notre plasmide linéarisé d'une taille de 3948 pb et une deuxième bande d'environ 1000 pb correspondant à l'insert (figure 9). Pour 10 souches de *V. splendidus*, deux minipréparations d'ADN plasmidique ont été ainsi sélectionnées pour le séquençage du gène *gyrB*.

II.5. Alignement et phylogénie

Les séquences du gène *gyrB* sont comparées avec des séquences d'autres *Vibrio* (EMBL) par le programme d'alignement *Clustal W*. L'arbre phylogénique réalisé par la méthode de Neighbour-joining montre clairement la séparation en trois groupes des *Vibrio splendidus* avec des valeurs de bootstrap supérieures à 90% (figure 10) : groupe 1 : sp3, sp5, sp11, sp12 et sp13 ; groupe 2 : sp1 et sp2 ; groupe 3 : sp6, sp7, sp8. Les séquences obtenues à partir de deux minipréparations pour chacune des souches sont équivalentes.

II.6. Carte de restriction et outils spécifiques

A partir de ces alignements, des oligonucléotides permettant l'amplification d'un fragment du gène *gyrB* chez tous les *Vibrio splendidus* ont été choisis : Gyr S et Gyr AS. Ces amorces encadrent une région polymorphe entre les *V. splendidus* biovar I et II. Ce polymorphisme implique des sites de restriction *TaqI*.

Figure 10 : Analyse phylogénique de 10 souches de *V. splendidus* et d'autres *Vibrio* réalisé après alignement des séquences du gène *gyrB* par la méthode neighbour-joining.

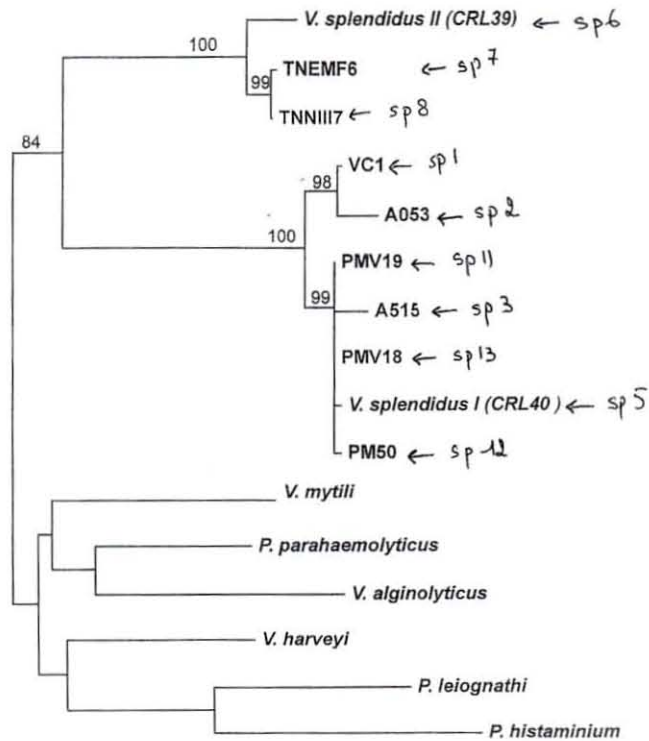
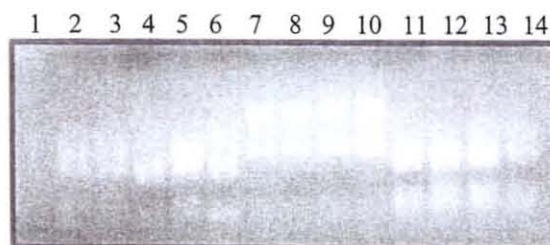


Figure 11 : Migration électrophorétique des fragments de restriction obtenus par digestion de l'enzyme *TaqI* des produits de PCR amplifiés avec les amorces GyrS/GyrAS à partir d'ADN des 13 souches de *V. splendidus*.



II.7. Analyse de la PCR RFLP du gène *gyrB*

Les fragments amplifiés à l'aide des oligonucléotides Gyr S et Gyr AS à partir d'ADN des 13 souches de *Vibrio splendidus* sont digérés par l'enzyme *TaqI*. Trois profils de restrictions sont obtenus (figure 11). A) le premier profil (sp1 ligne 2, sp2 ligne 3, sp4 ligne 5) possède 4 bandes de 253 pb, 190 pb, 112 pb et 52 pb. B) le second profil (sp3 ligne 4, sp5 ligne 6, sp10 ligne 11, sp11 ligne 12, sp12 ligne 13, sp13 ligne 14) est composé de 5 bandes de 190 pb, 182 pb, 112 pb, 81 pb et 52 pb. C) le dernier profil (sp6 ligne 7, sp7 ligne 8, sp8 ligne 9, sp9 ligne 10) est composé de 2 bandes de 385 pb et 233 pb.

III. DISCUSSION

Jusqu'à présent aucun critère ne permet de discriminer les souches de *Vibrio splendidus* entre elles et plus particulièrement celles qui sont virulentes. Deux approches complémentaires peuvent permettre de développer des outils de diagnostics permettant la détection de *Vibrio* ayant un pouvoir pathogène :

- 1) **du génotype au phénotype** : par un typage des bactéries en intra-spécifique, il est possible d'associer une souche particulière à une maladie.
- 2) **du phénotype au génotype** : par l'étude des mécanismes de virulence et la recherche des gènes impliqués : il est possible de caractériser la potentialité de virulence d'une souche bactérienne.

Notre étude s'est basée sur la première approche qui consiste donc à identifier les souches sur la base du polymorphisme génomique. En taxonomie moderne, le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S est une méthode courante pour l'étude des relations phylogénétiques entre des bactéries. Ce gène contient deux types de régions, les unes très conservées sont utilisées pour définir les relations entre taxons éloignés, les autres très variables permettent de différencier les genres voire les espèces (Fox et al., 1992).

Dans le cas des différents *Vibrio splendidus*, les différences entre séquences 16S sont très faibles et il est difficile de distinguer chaque espèce sur l'unique base de ce gène (Le Roux et al., publication en cours).

Les gènes ribosomiques sont présents en copies multiples dans le génome des procaryotes comme des eucaryotes. La première partie de ce travail a consisté à comparer les séquences de plusieurs copies du gène 16S présentes dans une souche isolée. Nos résultats montrent que, pour la plupart des souches de la collection, au moins deux séquences, repérables par PCR RFLP, sont présentes (Figure 6). Deux explications sont possibles : 1) les souches sont contaminées par d'autres bactéries 2) il existe un polymorphisme entre

copies de ce gène. Dans ce cas, à partir de quelle séquence effectuer l'étude phylogénétique ?

Fox et al. (1992) ont reporté que l'étude du 16S chez les bactéries *Bacillus* n'était pas un critère suffisant pour garantir l'appartenance à une espèce. En fait, la méthode d'hybridation ADN/ADN entre la souche étudiée et une souche de référence reste le critère de définition d'une espèce pour les bactériologistes (hybridation entre deux génomes supérieure à 70%). Cependant cette technique est difficile et nécessite une étude taxonomique préalable pour choisir la souche de référence.

Récemment, l'équipe d'Harayama a proposé l'utilisation d'un autre gène d'intérêt phylogénique, le gène *gyrB*, comme alternative à l'hybridation ADN/ADN pour l'étude taxonomique de souches de bactérie en inter et intra-spécifique (Kasthuri et al., 1998).

La deuxième partie de ce travail a consisté à étudier les séquences du gène *gyrB* des différentes souches de notre collection. En raison de difficultés techniques, les séquences de 10 souches seulement ont été obtenues.

Pour chaque souche, deux plasmides issus du clonage ont été analysés. Nous n'avons pas détecté de différence de séquences entre plasmide. Ceci montre que la variabilité de séquences observée avec le gène 16S est due à un polymorphisme entre copie du même gène.

L'alignement des séquences *gyrB* des 10 souches de *V. splendidus* nous a permis de construire un arbre phylogénique (Figure 10). La séparation du groupe *V. splendidus* biovar II est confirmée. Il s'agirait d'une nouvelle espèce. De plus, deux autres groupes sont mis en évidence, l'un constitué de 5 souches dont celle de référence *Vibrio splendidus* biovar I, l'autre constituée des deux souches sp1 et sp2. *Vibrio splendidus* apparaît donc comme un groupe complexe contenant au moins 3 espèces distinctes. Ces résultats devront être confirmés dans l'avenir par des expériences d'hybridation ADN/ADN.

L'alignement des séquences nous a aussi permis de développer un outil de détection et de discrimination des *V. splendidus* par PCR d'un fragment du gène *gyrB* et digestion par *TaqI* (PCR-RFLP). Cet outil a été validé à partir d'ADN extrait des 13 souches de la collection (Figure 11). Trois profils de restriction sont obtenus et sont corrélés au groupe taxonomique mis en évidence dans l'arbre phylogénique. Les souches qui n'avaient pas été analysées en séquençage du gène *gyrB*, sp4 / sp10 et sp9, peuvent ainsi être rapprochées respectivement des groupes biovar I et biovar II.

IV. CONCLUSION

L'analyse des séquences du gène *gyrB* de souches *V. splendidus* a permis d'éclaircir la taxonomie complexe de ce groupe de *Vibrio*. Les critères phénotypiques basés sur des tests biochimiques et le génotypage basé sur la séquence 16S permettent de discriminer ce groupe des autres espèces éloignées appartenant au même genre. Notre étude montre que *V. splendidus* biovar I et biovar II sont deux espèces distinctes et suggère l'existence d'une troisième espèce. Les outils de détection développés vont nous permettre d'élargir la collection de souches pour chacune de ces espèces afin de confirmer ces résultats.

BIBLIOGRAPHIE

COMPS M. et DUTHOIT J.L. (1976). Infection virale associée à "la maladie des branchies" de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* Lmk. C. R. Hebd. Séanc. Acad. Sc. **283**, 1595-1596.

LE DEUFF R.M., NICOLAS J.L., RENAULT T. et COCHENNEC N. (1994). Experimental transmission of herpes-like virus to axenic larvae of pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Bull. Eur. Fish Pathol. **142**, 69-71.

FARTO R., MONTES M., PEREZ M.J., NIETO T.P., LARSEN J.L., and PEDERSEN K. (1999). Characterization by numerical taxonomy and ribotyping of *Vibrio splendidus* biovar I and *Vibrio scophthalmi* strains associated with turbot cultures. J. appl. Microbiol., **86**, 796-804.

GATESOUBE F.J., C. LAMBERT and J.L. NICOLAS (1999). Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. Journal of applied microbiology, **87**, 757-763.

GRIZEL H., COMPS M., COUSSERANS F., BONAMI J.R., et VAGO C. (1974). Etude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate. C.R. Acad. Sci. (Paris) **279**, 783-784.

LACOSTE A., JALABERT F., MALHAM S., CUEFF A., GELEBART F., CORDEVANT C., LANGE M., POULET S.A. (2001). A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the bay of Morlaix (North Brittany, France). Dis. Aquat. Org., sous presse.

LAMBERT C., J.L. NICOLAS ; V. CILIA (1999). *Vibrio splendidus* related strain isolated from brown deposit in scallop (*pecten maximus*) cultured in Brittany (France). Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol., **19** (3), 102.

PICHOT Y., COMPS M., TIGE G., GRIZEL H. et RABOUIN M.A. (1980). Recherche sur *Bonamia ostrea* gen. n., parasite nouveau de l'huître plate, *Ostrea edulis*. L. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit. **43**, 131-140.

SAIKI R.K., SCHARF S., FALCOMA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERLICH H.A. et ARNHEIM N. (1985). Enzymatic amplification of globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science **230**, 1350-1354.

SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74** : 5463-5467.

URAKAWA HIDETOSHI, KUMIKO KITA-TSUKAMOTO, KOUICHI OHWADA (1997). 16S rDNA genotyping using PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis among the family Vibrionaceae. FEMS Microbiol. Lett. 125-132

VENKATESWARAN K., DOHMOTO N. and HARAYAMA S. (Feb. 1998). Cloning and nucleotide sequence of the gyr B gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp. Appl. Environ. Microbiol. p. 681-687.

WAECHTER M., LE ROUX F., NICOLAS J.L., MARISSAL E. et BERTHE F. (soumis).
Caractérisation de bactéries pathogènes de naissains d'huître creuse *Crassostrea gigas*.

ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

dNTP : désoxyribonucléotide

BET : bromure d'éthidium

DO : densité optique

EDTA : ethylene diamine tétraacetic acid

LB : Luria Bertani

NaOH : hydroxide de sodium

pb : paire de bases

PCR : polymerase chain reaction

RFLP : restriction fragment length polymorphism

SDS : sodium dodecyl sulfate

TAE: tris acetate EDTA (tris acétate 0.04M, 1 mM EDTA)

TE : tris 10 mM -EDTA

Tris : hydroxymethyl aminomethane

X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside