

UFR SCIENCES & TECHNIQUES DE PAU  
Université de Pau et des Pays de l'Adour

MASTER 2<sup>ème</sup> année de Microbiologie et Biotechnologies (MICROBIO)



**Les facteurs écophysiologiques et  
génétiques ainsi que la ploïdie  
influencent-ils la réponse  
de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*,  
à une infection par des *Vibrio* ?**

**Sophie CASTAGNET**

**Stage effectué du 17 Mars au 17 Septembre 2008**  
au Laboratoire de Génétique et de Pathologie (LGP) à la station IFREMER de La  
Tremblade - Avenue du Mus du Loup, 17390 La Tremblade  
**Sous la direction scientifique de Denis SAULNIER**  
et des co-encadrants Sophie DE DECKER et Julien NORMAND



« Le document ci-joint est le résultat d'un travail effectué par un étudiant de Master II. Il est tel qu'il a été remis par l'étudiant et ne comporte aucune correction ni commentaire. Il doit être considéré comme un exercice de formation. »

IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 03838

## REMERCIEMENTS

---

Je tiens tout d'abord à remercier Messieurs Jean PROU, Directeur de la station IFREMER de La Tremblade, et Tristan RENAULT, Directeur du LGP (Laboratoire de Génétique et de Pathologie) de m'avoir accueillie.

Je tiens également à remercier mon maître de stage, Monsieur Denis SAULNIER, et mes deux co-encadrants Sophie de DECKER et Julien NORMAND, pour m'avoir appris énormément durant ce stage, pour m'avoir transmis leur passion pour leur travail et pour m'avoir aidée. Je tiens à leur exprimer toute ma gratitude pour leur gentillesse, leur patience et leur dévouement. Leurs précieux conseils m'ont été d'un grand secours, tout au long de ces six mois de stage.

Enfin, je tiens à remercier l'ensemble du personnel de la station et plus particulièrement celui du LGP (Amélie, Benjamin, Delphine, Géraldine, Jean-François, Justine, Matangi, et Nicole) pour leur accueil et leur sympathie.

## TABLE DES MATIERES

<b>I- INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>II- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>3</b>
II.1. L'OSTREICULTURE ET SES PARTICULARITES .....	3
II.1.1. Un secteur économique important.....	3
II.1.2. Principales caractéristiques de l'élevage ostréicole.....	3
II.1.3. Caractéristiques générales de <i>Crassostrea gigas</i> .....	4
II.1.3.1. Systématique .....	4
II.1.3.2. Biologie .....	4
II.1.3.2.1. Morphologie et cycle de vie.....	4
II.1.3.2.2. Reproduction .....	5
II.1.3.2.3. Mécanismes de défense immunitaire .....	6
II.2. LES PATHOGENES ASSOCIES AUX PHENOMENES DE MORTALITES ESTIVALES .....	6
II.2.1. Les pathogènes identifiés lors des mortalités estivales.....	6
II.2.2. Les bactéries du genre <i>Vibrio</i> : généralités.....	7
II.2.3. Virulence des <i>Vibrio</i> et leur facteur de virulence .....	8
II.2.3.1. Notion de virulence.....	8
II.2.3.2. Facteurs de virulence.....	8
II.2.4. Les <i>Vibrio</i> étudiés et leurs caractéristiques.....	9
II.2.4.1. <i>Vibrio splendidus</i> .....	9
II.2.4.2. <i>Vibrio aestuarianus</i> .....	9
II.3. GESTION DES MORTALITES EN OSTREICULTURE.....	10
II.3.1. Action sur l'environnement d'élevage .....	10
II.3.2. Amélioration génétique de l'huître .....	10
II.3.2.1. Gestion de la variabilité génétique.....	11
II.3.2.2. Sélection génétique.....	11
II.3.2.3. Triploïdie.....	12
<b>III- MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>14</b>
III.1. MATERIEL BIOLOGIQUE ET INFECTIONS EXPERIMENTALES .....	14
III.1.1. Les huîtres, <i>Crassostrea gigas</i> .....	14
III.1.2. Les <i>Vibrio</i> .....	16
III.2. LES OUTILS DE CARACTERISATION DES VIBRIO .....	16
III.2.1. Quantification de <i>Vibrio splendidus</i> et <i>Vibrio aestuarianus</i> .....	16
III.2.1.1. Préparation des cultures bactériennes et des échantillons.....	16
III.2.1.2. Construction des courbes de croissance .....	17
III.2.1.2.1. Dosages spectrophotométriques et comptages sur boîte.....	17
III.2.1.2.2. Quantification des souches bactériennes par PCR quantitative .....	17
III.2.2. Mesure de l'activité métalloprotéase.....	18
III.2.3. Immuno-histologie.....	19
III.2.3.1. Réalisation des lames d'histologie.....	19
III.2.3.2. Réactions d'immuno-histologie.....	19
III.2.3.3. Analyse en microscopie à lumière blanche .....	20
III.3. OUTILS DE DESCRIPTION DE L'HUITRE <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> (HOTE).....	20
III.3.1. Pesées .....	20
III.3.2. Stades de maturité sexuelle et occupation gonadique.....	21
III.3.3. Contrôle de la ploïdie par cytométrie en flux.....	23
III.3.4. Génotypage.....	24
III.3.4.1. L'extraction d'ADN.....	24
III.3.4.2. Le dosage spectrophotométrique de l'ADN extrait.....	24
III.3.4.3. La PCR en multiplex .....	24
III.3.4.4. Le génotypage .....	25
III.4. ANALYSES STATISTIQUES .....	25
<b>IV- RESULTATS.....</b>	<b>26</b>
IV.1. COMPARAISON DES SURVIES AUX INFECTIONS EXPERIMENTALES .....	26
IV.1.1. Comparaison des survies des huîtres diploïdes aux quatre périodes de gamétogenèse .....	26
IV.1.2. Comparaison des survies entre huîtres diploïdes et triploïdes .....	26
IV.2. CARACTERISATION DES VIBRIO .....	27
IV.2.1. Courbes de croissance de <i>V. aestuarianus</i> et <i>V. splendidus</i> .....	27
IV.2.1.1. Dosages spectrophotométriques.....	27
IV.2.1.2. Quantification des souches bactériennes par comptages sur boîte et par PCR quantitative .....	27
IV.2.2. Mesure de l'activité métalloprotéase in vitro .....	28
IV.2.3. Localisation du pathogène TR32 chez l'hôte par immuno-histologie.....	29
V.3. DESCRIPTION DE L'HUITRE <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> .....	30
IV.3.1. Description de la croissance.....	30

IV.3.1.1. Masse totale .....	30
IV.3.1.2. Masse de chair sèche .....	30
IV.3.1.3. Calcul des IC .....	31
IV.3.2. Description de la gonadogénèse .....	32
IV.3.3. Analyse de parenté par génotypage .....	33
<b>V- DISCUSSION .....</b>	<b>35</b>
V.1. VIBRIO SPLENDIDUS ET VIBRIO AESTUARIANUS : DEUX PATHOGENES A PHYSIOLOGIE DIFFERENTE ? .....	35
V.1.1. Deux <i>Vibrio</i> à la croissance différente .....	35
V.1.2. Croissance et activité métalloprotéase modulées par les conditions de culture .....	35
V.1.3. Un mécanisme de virulence contrôlé par un phénomène de quorum-sensing ? .....	36
V.1.4. Un phénomène de synergie à explorer .....	37
V.1.5. <i>Vibrio splendidus</i> TR32 localisée dans de nombreux tissus de l'huître creuse .....	38
V.2. RECHERCHE DES FACTEURS INFLUENÇANT LA CAPACITE DE RESISTANCE DE L'HUITRE A UNE VIBRIOSE... ..	38
V.2.1. Effet de la gonadogénèse .....	38
V.2.2. Effet de l'état de santé .....	39
V.2.3. Effet de la ploïdie .....	39
V.2.4. Effet d'une composante génétique .....	40
<b>VI- CONCLUSION .....</b>	<b>41</b>
<b>VII- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>42</b>

## I- INTRODUCTION

---

Depuis une quinzaine d'années, des mortalités massives d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*, sont observées sur le littoral français durant la période estivale. Ces mortalités touchent principalement les naissains et les huîtres de moins de deux ans (Soletchnik, 2007). Des études ont démontré que les mortalités sont plurifactorielles (Samain *et al.*, 2007) et qu'elles sont la résultante d'interactions entre l'environnement, l'huître (physiologie et génétique) et certains agents infectieux. Notamment, deux bactéries du genre *Vibrio* fréquemment associées aux mortalités ont été identifiées : *Vibrio splendidus* et *Vibrio aestuarianus*. Certaines souches appartenant à ces deux espèces ont été particulièrement étudiées en caractérisant leur variabilité génétique ainsi que leur pouvoir pathogène (Lacoste *et al.*, 2001; Waechter *et al.*, 2002; Gay *et al.*, 2004a et b; Le Roux *et al.*, 2004; Garnier *et al.*, 2007; Labreuche *et al.*, 2006).

Dans le cadre du projet MOREST (MORTalités ESTivales), les rôles de l'hôte, de l'environnement et des pathogènes dans l'apparition des épisodes de mortalités estivales ont été beaucoup étudiés. Pour cela, de nombreuses expérimentations ont été menées *in situ*. A la suite de ce programme, la température, l'investissement énergétique de l'huître ainsi que des facteurs génétiques ont été identifiés comme des paramètres explicatifs de la sensibilité des huîtres aux épisodes de mortalités estivales.

Dans ce contexte, il est intéressant d'étudier plus particulièrement les interactions entre l'huître et les *Vibrio*. La sensibilité de l'huître à une vibriose est le résultat des interactions entre les caractéristiques biologiques de l'huître et la virulence du pathogène, dépendants de facteurs environnementaux. Il est donc important de comprendre et d'étudier les facteurs influençant cette sensibilité. La mise au point de modèles d'infection expérimentale de l'huître creuse, par les souches pathogènes *V. splendidus* et *V. aestuarianus*, permet aujourd'hui de caractériser en condition expérimentale contrôlée la sensibilité des huîtres à une vibriose et constitue un outil de choix dans l'étude des facteurs influençant la réponse de l'hôte. Cet outil nous permet également de disposer de matériel biologique contrasté (vivant ou mort).

La sensibilité de l'huître dépend notamment de l'énergie disponible dans le milieu pour résister à un stress. La quantité d'énergie disponible est variable au cours de l'année, et doit donc se traduire par une sensibilité différente en fonction des saisons, d'autant que l'huître mobilise cette énergie pour assurer d'autres fonctions physiologiques, la reproduction et la croissance, dont l'intensité est également extrêmement variable en fonction des saisons ou de la ploïdie des animaux (Samain *et al.*, 2007). De plus, une composante génétique dans la sensibilité des huîtres à une vibriose est observée avec l'obtention de familles présentant une réponse contrastée aux phénomènes de mortalités estivales (Samain *et al.*, 2007). Par ailleurs, il semblerait que plus de la moitié des huîtres consommées en France soient des huîtres triploïdes (J. Normand, communication personnelle). Ces huîtres allouent différemment l'énergie dans leur fonction physiologique (reproduction et croissance) laissant présager qu'elles sont différentes des diploïdes dans leur capacité de résistance à un stress (Normand *et al.*, *in prep.*). De plus, des études portant sur d'autres modèles ont montré que l'induction de la triploïdie impactait fortement la transmission des caractères génétiques parentaux à la descendance (Blanc *et al.*, 2001). Il est probable que la composante génétique impliquée dans les mécanismes de sensibilité de l'huître creuse aux *Vibrio* soit également affectée.

Le travail réalisé durant ce stage a pour objectif l'étude de facteurs de l'hôte (origine génétique et physiologie de la reproduction) et des vibrions (doses infectantes, production d'un facteur de virulence), pouvant impacter la sensibilité de l'huître creuse, diploïde et triploïde, soumise à une infection expérimentale par des *Vibrio*.

Ainsi, une approche *in vitro* du pathogène a été réalisée en établissant une cinétique de croissance des deux *Vibrio* couplée à la mesure de la production de métalloprotéase (seul facteur de virulence connu

chez ces bactéries) présente dans les surnageants de culture. De plus, une analyse par immuno-histologie a été menée afin de localiser le pathogène dans les différents tissus de l'huître infectée par balnéation. Par ailleurs, des individus issus de mêmes parents et de ploïdie différente ont été produits à l'écloserie de la station IFREMER de La Tremblade. Leur sensibilité à une vibriose a été caractérisée par infection expérimentale à différents stades de maturation de la gonade. Ainsi, sur la base des différentiels de survies obtenus et grâce à diverses techniques, les effets, de la gonadogénèse, de l'état de santé, de la ploïdie et d'une composante génétique, sur la sensibilité de l'huître creuse à une vibriose expérimentale ont été étudiées.

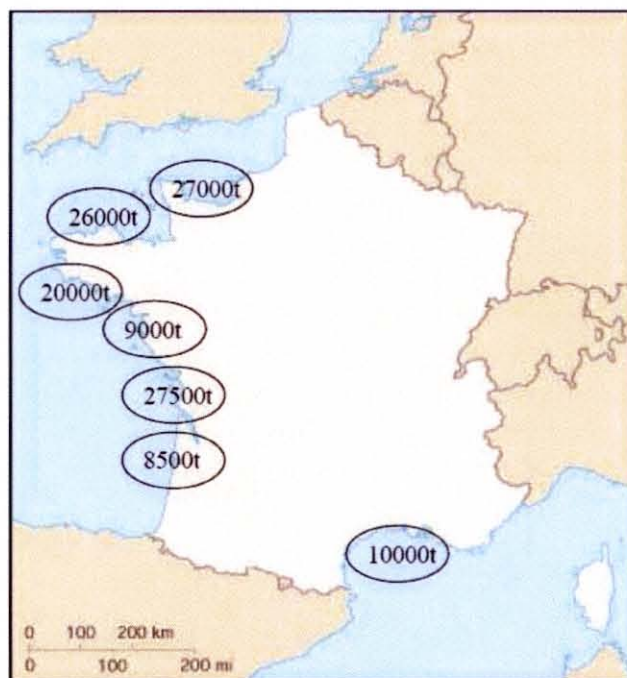
## II- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### II.1. L'ostréiculture et ses particularités

#### II.1.1. Un secteur économique important

En 2006, la production globale de l'huître creuse *Crassostrea gigas* était estimée à 4,6 millions de tonnes (Mt) pour une valeur marchande estimée à environ 3,7 milliards de dollars. Cela représente la production d'aquaculture la plus importante en tonnage devant celles des autres poissons ou crustacés. Près de 84% (3.7Mt) de cette production globale est aujourd'hui réalisée sur le littoral chinois (FAO, 2006).

La France occupe aujourd'hui le quatrième rang mondial et le premier européen pour la production de l'huître japonaise avec 127 700 tonnes produites en 2006, représentant 65.5% des coquillages produits (OFIMER, 2008). En plus de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, la France produit dans une moindre mesure l'huître plate, *Ostrea edulis*. Mais l'huître creuse équivaut à elle seule à 98% de la production ostréicole française. La région Poitou-Charentes, et principalement le bassin de Marennes-Oléron, est l'une des régions les plus importantes de production française d'huître creuse avec 21.8% de la production nationale (CNC, 2006-2007). La Normandie (21.4%), la Bretagne Nord (20.6%), la Bretagne Sud (13.8), la Méditerranée (7.9%), le Pays de la Loire (7.5%) et l'Aquitaine (6.7%) sont les cinq autres régions de production de cette huître. (Figure 1) (Sauvage, 2008)



**Figure 1 : Répartition de la production de l'huître creuse sur les sites d'élevage français en 2006. (Sauvage, 2008)**

#### II.1.2. Principales caractéristiques de l'élevage ostréicole

Le cycle d'élevage de l'huître creuse se déroule majoritairement en milieu ouvert. Les jeunes huîtres (naissains) proviennent du captage naturel des larves sur le terrain ou de la production de larves en éclosérie. Le captage consiste à disposer, au cours de l'été, des structures appelées collecteurs et destinées à servir de support de fixation pour les larves d'huîtres (jusque là planctoniques) avant leur métamorphose. Six à dix-huit mois après la fixation, les huîtres sont détachées ("détroquées") de ces supports.

Les écloséries sont des établissements destinés à l'élevage larvaire et à la micronurserie, leur production représente une part croissante du naissain mis en élevage car elles permettent de s'affranchir

pour une part des aléas du recrutement naturel, ce sont également les structures qui assurent la production de naissain triploïde.

L'élevage des individus fixés (depuis le stade naissain jusqu'au tailles commerciales) s'effectue dans le milieu naturel, à proximité des côtes. Les huîtres sont élevées en poches grillagées posées sur des tables métalliques, "semées" sur des terrains pour l'élevage à plat, ou collées à des cordes pour l'élevage en suspension (Méditerranée principalement). Dans certains cas, les huîtres sont affinées en claires avant commercialisation, la durée d'élevage et les densités dans ces claires correspondant à différentes appellations (Fines de claires, Spéciales de claires et Pousse en claire)(Gay, 2004). L'élevage de *Crassostrea gigas* s'effectue donc majoritairement en conditions non-contrôlées, contrairement à d'autres filières d'aquaculture, comme les piscicultures pour les Salmonidés, pour lesquelles les élevages sont réalisés dans des milieux fermés et contrôlés.

### II.1.3. Caractéristiques générales de *Crassostrea gigas*

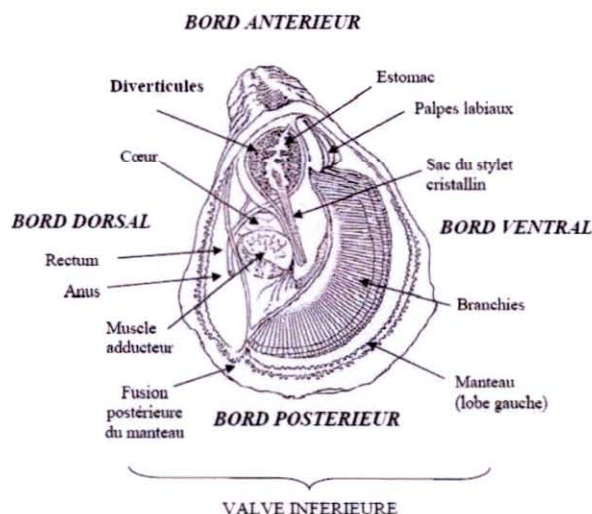
#### II.1.3.1. Systématique

*Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) appartient à l'embranchement des Mollusques, classe des Bivalves (ou Lamellibranches), ordre des *Filibranchia*, sous-ordre des *Anisomyaria*, super-famille des *Ostreoidea*, famille des *Ostreidae*, genre *Crassostrea* et espèce *gigas*.

#### II.1.3.2. Biologie

##### II.1.3.2.1. Morphologie et cycle de vie

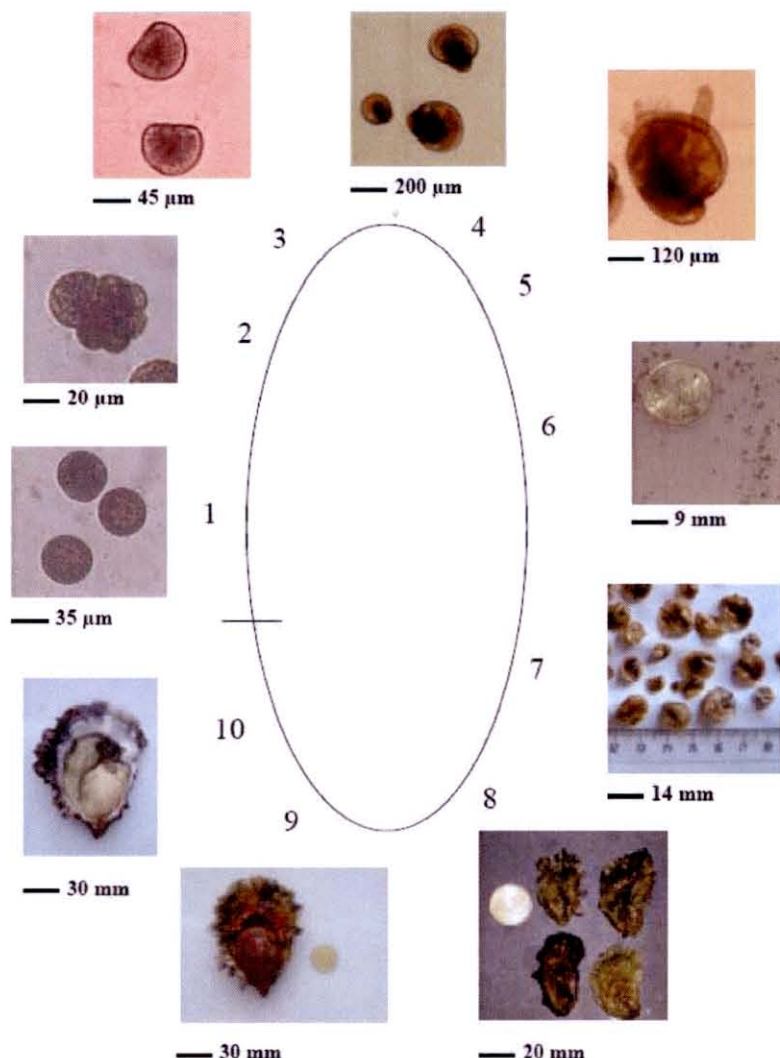
Chez *Crassostrea gigas*, la coquille de l'adulte (dont la genèse est continue et assurée par le manteau) est asymétrique. Les deux valves qui la composent sont différentes en taille et en forme et reliées par la charnière (Gagnaire, 2005). La valve supérieure est plate (légèrement convexe), tandis que la valve inférieure est nettement creusée. La coquille, dont l'ouverture et la fermeture sont assurées par le muscle adducteur, protège le corps de l'animal (manteau, branchies, bouche encadrée par les palpes labiaux, anus, œsophage, estomac, intestin, rectum, gonade et cœur). Les huîtres sont des filtreurs, suspensivores et planctonophages. Leur appareil branchial cilié crée un courant d'aspiration des particules qui sont captées par les filaments branchiaux, dirigées vers les palpes labiaux, triées et finalement mangées, ou recrachées sous la forme de pseudo-fécès. Leur appareil circulatoire est dit de type lacunaire ou semi-ouvert, en contact constant avec le milieu extérieur. Et enfin, leur système nerveux est formé de plusieurs paires de ganglions nerveux (cérébroïdes et viscéraux) (Taris, 2005) (Figure 2).



**Figure 2 :** Anatomie de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, adulte. (Sauvage, 2008)



Le cycle de vie de l'huître creuse présente une particularité intéressante. En effet, il se déroule en deux phases principales : une phase larvaire libre ou pélagique (étapes 1 à 5, Figure 3) suivie d'une phase benthique ou fixée sur un support (étapes 6 à 10, Figure 3). (Sauvage, 2008)



**Figure 3 : Cycle biologique de l'huître creuse.**

1-fécondation : ovocytes en présence de spermatozoïdes (points noirs) ; 2-embryon au stade morula (2-3 heures) ; 3-larves D (24 heures) ; 4-larves véligères (14 jours) ; 5-larve pédiveligères (18 jours) ; 6- naissains post-fixation (1 mois) ; 7-naissains (2 mois) ; 8-naissains (6 mois) ; 9-adulte (10 mois) ; 10-géniteur mature (10 mois). (Sauvage, 2008)

#### II.1.3.2.2. Reproduction

L'huître creuse est une espèce à fécondation externe, et a forte fécondité. Les sexes sont séparés, mais *C. gigas* présente un hermaphrodisme successif asynchrone. En effet, les adultes peuvent changer de sexe au cours du temps, avec une tendance à la protandrie (premières années de reproduction en tant que mâle). En milieu naturel, la maturation gonadique suit un cycle annuel, elle se déroule lentement d'octobre à mars, et au printemps les tubules gonadiques se développent de façon active pour atteindre la maturité sexuelle au cours de l'été. La dynamique et la qualité de la gamétogenèse sont sous le contrôle de facteurs internes (patrimoine génétique et état physiologique de l'individu) et de facteurs externes (température et nourriture principalement). Arrivés à maturité, les géniteurs expulsent les gamètes dans le milieu (fécondation externe). L'effort de reproduction (la quantité d'énergie consacrée à la production de produits sexuels) est

particulièrement élevé chez *Crassostrea gigas*, et peut atteindre 80 à 90% de la masse de chair de l'huître (Deslou-Paoli et Héral, 1988). Dans la mesure où l'énergie acquise par la nutrition est répartie entre les fonctions de reproduction et de croissance, il apparaît une corrélation négative entre l'intensité de la reproduction et la survie (Erande *et al.*, 2004). Cette forte fécondité a été décrite comme un facteur favorisant la susceptibilité des individus à un stress (Samain *et al.*, 2007).

#### II.1.3.2.3. Mécanismes de défense immunitaire

La fonction principale du système immunitaire chez tous les animaux est de fournir une protection contre les agents infectieux (parasites, bactéries, virus et champignons) et les tumeurs et de rejeter les composants étrangers de l'animal. Chez les vertébrés, il existe des cellules spécialisées, les lymphocytes (B et T) qui sont à l'origine de la mémoire immunitaire. Ces cellules sont responsables des mécanismes de défense avec la production d'anticorps. Par contre, chez les mollusques et les invertébrés, dont les bivalves marins, les mécanismes de défense ne reposent pas sur des cellules spécialisées telles que les lymphocytes. Il n'y a donc pas de phénomène de mémoire immunitaire ni de réponse immunitaire spécifique comme on peut l'observer chez les vertébrés. Cependant il existe tout de même des cellules impliquées dans ces mécanismes, à savoir les hémocytes et des molécules circulantes possédant des activités vis-à-vis des agents infectieux. (Gagnaire, 2005)

Les hémocytes sont des cellules véhiculées par l'hémolymphe dans un système circulatoire de type semi-ouvert et présentes dans tout l'animal. En effet, les hémocytes peuvent présenter différentes localisations : dans le compartiment circulatoire (vaisseaux et sinus), mais aussi dans les tissus (glande digestive, manteau, branchies, gonades,...). On parle alors d'hémocytes fixés. Ces cellules interviennent dans les activités de défenses contre les agents infectieux, en particulier par le biais de la phagocytose. Ce phénomène correspond au processus par lequel une cellule est capable d'internaliser un corps étranger et de le dégrader après cette internalisation. Il se divise en plusieurs étapes : la reconnaissance, l'internalisation et la dégradation. En plus de la phagocytose, les hémocytes ont aussi d'autres fonctions. Ils sont capables de réparation des blessures et de la coquille, de sécrétion et d'excrétion et de digestion et de transport des nutriments. (Cheng, 1981)

Enfin, les molécules circulantes impliquées dans les mécanismes de défense peuvent être des enzymes hydrolytiques, des lectines, des systèmes phénoloxydase, des protéines de stress (Heat Shock Protein ou HSP), des systèmes oxide nitrique synthétase, des peptides anti-microbiens, des molécules de type cytokine,...

### **II.2. Les pathogènes associés aux phénomènes de mortalités estivales**

De nombreux épisodes de mortalité anormale ont été observés chez *C. gigas* et une grande variété d'agents pathogènes y ont été associés, comme des parasites, des virus, des champignons et des bactéries.

#### II.2.1. Les pathogènes identifiés lors des mortalités estivales

Depuis 1991, et principalement durant l'été lorsque la température de l'eau augmente, des mortalités récurrentes de naissains de *C. gigas* (60 à 100%) se produisent aussi bien dans les parcs ostréicoles que dans les écloséries. Le caractère violent et imprévisible de ces mortalités estivales est un problème majeur pour la filière ostréicole. Des études indiquent une étiologie complexe incluant plusieurs facteurs : les conditions environnementales, des agents infectieux, la physiologie et la génétique de l'huître (Samain *et al.*, 2007)

Aujourd'hui, si aucun agent pathogène particulier ne semble être associé de manière systématique aux épisodes de mortalités estivales, des bactéries du genre *Vibrio* ainsi qu'un herpes virus-like (Ostreid Herpes Virus type 1 ou OsHV-1) ont été diagnostiqués de façon concomitantes au déclenchement de celles-

ci. Ces observations laissent penser que les mortalités estivales ne correspondent pas à une épizootie faisant intervenir un agent infectieux unique. Ces agents pathogènes ont été détectés lors de mortalités anormales ; certains seuls ou en combinaison (par exemple l'association du virus OsHV-1 et d'un *Vibrio* dominant) ont pu être impliqués dans certains épisodes mais tous les épisodes de mortalité ne peuvent s'expliquer par la seule présence d'agents pathogènes (Samain et McCombie, 2007a). En effet, des facteurs environnementaux (dessalure, toxicité du sédiment, polluants, blooms phytoplanctoniques toxiques...), zootechniques (forte densité, manipulation lors de la période de reproduction des coquillages...), physiologiques (maturation, faible croissance...) peuvent intervenir de manière directe ou indirecte dans les mortalités constatées et c'est fréquemment l'association de plusieurs de ces facteurs qui est à l'origine de ces épisodes. (Samain *et al.*, 2007).

### II.2.2. Les bactéries du genre *Vibrio* : généralités

Les bactéries du genre *Vibrio* sont typiquement aquatiques et principalement marines. Elles appartiennent à la famille des Vibrionaceae, à la classe des  $\gamma$ -protéobactéries. Les vibrions sont des bacilles Gram-négatifs, droits ou incurvés, de 0.5 à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre sur 1.2 à 3.5  $\mu\text{m}$  de longueur, non-sporulés. Ces bactéries sont en général mobiles grâce à la présence d'un ou plusieurs flagelles polaires. Elles ont un métabolisme de type aéro-anaérobies facultatifs, sont mésophiles, chimio-organotrophes et présentent un métabolisme oxydatif et fermentatif. Elles sont le plus souvent oxydase positives et nitrate réductase positives. Elles sont capables de croître dans un milieu minéral contenant du glucose comme unique source de carbone et des ions  $\text{NH}_4^+$  comme unique source d'azote. Les *Vibrio* sont généralement cultivés sur milieu « marine agar » (« marine broth » ou milieu Zobell) ou sur gélose Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose agar (milieu TCBS).

D'un point de vue moléculaire, le séquençage des génomes de nombreuses espèces de *Vibrio* ainsi que leur analyse par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) ont montré que le génome des *Vibrio* est constitué de deux chromosomes circulaires, appelés chromosomes I et II (Yamaichi *et al.*, 1999). Le chromosome I est de plus grande taille (3Mb contre 1 à 2Mb) et présente la majorité des gènes impliqués dans la réplication, la transcription, la traduction et la biosynthèse, tout comme les gènes intervenant dans la pathogénicité. Le chromosome II contient une part plus importante de gènes hypothétiques ou de fonctions inconnues (Heidelberg *et al.*, 2000).

Les écosystèmes marins abritent de nombreuses bactéries appartenant au genre *Vibrio*. Ces bactéries sont ubiquistes et sont présentes à l'état libre (planctoniques) ou retrouvées dans les tissus de la quasi totalité des animaux aquatiques, chez les mollusques en particulier (Thompson *et al.*, 2004). Elles sont présentes sur la coquille, dans l'eau intervalvaire, dans l'hémolymphe et dans le tractus digestif des mollusques. Elles constituent une grande part de la flore bactérienne cultivable des mollusques et sont considérées comme commensales (Gay, 2004). On parle alors de bactéries commensales. Par ailleurs, des bactéries du genre *Vibrio* forment des symbioses avec d'autres organismes marins. L'exemple le plus parlant est celui du calmar hawaïen *Euprymna scolopes*. En effet, ce dernier a un organe lumineux (en position ventrale) qui le protège des prédateurs qui le confondent avec le reflet de la lune. Cette luminescence est due à la présence de *Vibrio fischeri* qui colonise l'organe peu après la naissance du calmar. La relation entre l'animal et la bactérie est très spécifique puisque seule *Vibrio fischeri* est capable de coloniser cet organe lumineux (Kimbell et McFall-Ngai, 2003).

Si la plupart des vibrions sont des bactéries commensales ou symbiontes, il en existe des pathogènes. Les pathogènes de l'homme les plus connus sont : *Vibrio cholerae* (agent du choléra), *V. vulnificus* (septicémie primaire liée à une intoxication alimentaire après consommation de coquillage et

infection de blessures exposées à l'eau de mer) et *V. parahaemolyticus* (pathologie de type diarrhéique). En ce qui concerne les pathogènes de mollusque, *V. splendidus* et *V. aestuarianus* sont connus pour être des pathogènes de l'huître creuse *C. gigas*. En effet, ces deux bactéries sont généralement associées aux mortalités massives durant l'été. Certaines souches appartenant aux groupes *V. splendidus* et *V. aestuarianus* ont été particulièrement étudiées et leur pouvoir pathogène a été démontré par infection expérimentale d'huîtres saines (Lacoste *et al.*, 2001 ; Waechter *et al.*, 2002, Le Roux *et al.*, 2004).

### II.2.3. Virulence des *Vibrio* et leur facteur de virulence

#### II.2.3.1. Notion de virulence

Les postulats de Koch (1890) ont été définis afin de déterminer la responsabilité d'un agent pathogène dans une maladie. Pour qu'il soit considéré comme responsable d'une maladie, il doit répondre à quatre conditions : cet agent doit être présent chez tous les individus présentant la pathologie ; il doit pouvoir être cultivé ; lorsqu'il est introduit chez l'hôte (ou dans un modèle s'en rapprochant), il doit induire le développement de la pathologie ; enfin, il doit pouvoir être isolé à nouveau à partir d'un animal présentant la maladie. D'après cette définition, le pathogène est défini comme un microbe capable de causer une maladie, indépendamment de l'hôte. Le pouvoir pathogène (la pathogénicité) est la capacité du pathogène à produire une maladie et la virulence, au sens strict du terme, correspond à la capacité du pathogène à se multiplier au sein de l'hôte. Mais de nombreuses études basées sur les interactions hôte/pathogène ont abouti à la conclusion que cette notion de virulence/pathogénicité n'est pas aussi simple et qu'elle est influencée par des facteurs de l'hôte et de l'environnement.

#### II.2.3.2. Facteurs de virulence

On considère généralement qu'un pathogène doit posséder cinq genres de facteur de virulence pour induire une maladie chez l'hôte : les facteurs impliqués dans l'adhérence et la mobilité (flagelles, pili et biofilms), ceux impliqués dans l'invasion de l'hôte (enzymes hydrolytiques comme des protéases, des lipases, des nucléases ou des hyaluronidases,...), les facteurs capables d'interférer avec les défenses immunitaires de l'hôte (encapsulation de la bactérie pour se protéger de la phagocytose), facteurs de multiplication au sein de l'hôte (acquisition du fer exogène nécessaire à la croissance bactérienne par exemple) et enfin les facteurs causant des dommages à l'hôte (exotoxines et endotoxines) (Labreuche, 2006).

Les différents types d'activités enzymatiques jouant un rôle dans la virulence de nombreuses bactéries pathogènes, incluent les protéases extracellulaires. Par exemple, de telles protéases ont été décrites chez *Vibrio cholerae* (Booth *et al.*, 1984), *Vibrio vulnificus* (Kothary et Kreger., 1987) et *Vibrio anguillarum* (Milton *et al.*, 1992). Elles agissent néanmoins de façon indirecte (maturation de la toxine cholérique par exemple) ou comme facteur de virulence accessoire.

Le séquençage du génome de la souche *Vibrio splendidus* LGP32 a été complété afin de pouvoir étudier tous les gènes. C'est ainsi que le gène *vsm* (*Vibrio splendidus* metalloprotéase) a été identifié, codant potentiellement pour une métalloprotéase contenant du zinc, qui pourrait jouer un rôle dans la pathogénicité (Miyoshi et Shinoda, 2000). Le produit du gène *vsm* (séquence d'acides aminés) présente 95% d'identité avec le produit du gène *vam* de *Vibrio anguillarum*, connu pour participer dans les propriétés de virulence de ce pathogène de poisson. Le rôle de cette métalloprotéase comme facteur de virulence de *V. splendidus* a été précisé. En effet, l'injection de surnageants de culture produits à partir de la souche mutée sur le gène codant la métalloprotéase ne présente pas de toxicité et n'entraîne pas de mortalités chez les huîtres, alors que l'injection de la souche mutée vivante induit toujours des mortalités en infection expérimentale. De ce fait, nous pouvons dire que la métalloprotéase de *V. splendidus* est un facteur de virulence essentiel mais non suffisant (Le Roux *et al.*, 2007).

#### II.2.4. Les *Vibrio* étudiés et leurs caractéristiques

Dans le cadre des mortalités anormales de 2003 à 2005 analysées par la cellule analytique de la station IFREMER de La Tremblade, il a été observé que 50% des bactéries dominantes appartiennent à *V. splendidus* et *V. aestuarianus*. De plus, l'analyse de 73 lots d'huître correspondant chacun à un épisode de mortalité chez *C. gigas* révèle pour huit d'entre eux une co-infection par *V. splendidus* et *V. aestuarianus* (Saulnier *et al.*, *in prep*).

##### II.2.4.1. *Vibrio splendidus*

*Vibrio splendidus* est un groupe phylogénétique présentant un fort polymorphisme génétique, composé d'au moins 8 espèces. Parmi celle-ci, deux pathogènes de l'huître creuse ont été décrits au Laboratoire de Génétique et de Pathologie de La Tremblade, *Vibrio gigantis* (Le Roux *et al.*, 2005) et *Vibrio crassostrea* (Faury *et al.*, 2004) isolées de l'hémolymphe de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Ces bactéries sont présentes dans de nombreux hôtes (poissons, pieuvres, gorgones) et ont été isolées également dans des échantillons de sédiments et d'eau marine. *Vibrio splendidus* est une espèce dominante du bactérioplancton. Une étude de Thompson *et al.* (2005) a montré que la flore Vibrionacée présente dans le bactérioplancton était largement représentée par *V. splendidus* (plus de 70% en été et en automne).

La souche LGP32 de *Vibrio splendidus* a été isolée à partir de l'hémolymphe d'une huître « sentinelle », devenu moribond à la suite d'une expérimentation de mise en contact avec des animaux provenant de Fouras, site subissant alors de fortes mortalités (situé à proximité de La Rochelle). Ces expérimentations consistaient en une cohabitation entre des huîtres d'apparence saine collectées sur différents sites de la façade atlantique à proximité d'huîtres subissant des mortalités estivales et des huîtres élevées au LGP (huîtres sentinelles) n'ayant jamais rencontré d'épisodes de mortalité. Ces expériences de mises en contact ont conduit, dans 9 cas sur 12 (selon la provenance des animaux), à une mortalité significative à 8 jours post cohabitation chez les animaux « sentinelles » (Gay *et al.* 2004a).

Cette souche est l'une des plus virulentes qui ait été isolée lors de ces expérimentations. Un modèle d'infection expérimentale reproductible a pu être obtenu et une DL50 a été déterminée : la dose de  $10^8$  UFC injectées par individu provoque 50% de mortalité cinq jours après infection (Gay *et al.* 2004b). Le génome complet de la souche LGP32 a été séquencé (le 5<sup>ème</sup> génome de *Vibrio* séquencé en totalité). Il a été alors identifié deux gènes codant pour deux enzymes appartenant à la famille des métalloprotéases, protéases impliquées dans la pathogénicité (Le Roux *et al.*, 2007). De plus, un programme de mutagenèse dirigée a été mené afin d'obtenir différentes souches mutées au niveau de gènes d'intérêt permettant de caractériser les mécanismes de virulence de cette souche.

##### II.2.4.2. *Vibrio aestuarianus*

*Vibrio aestuarianus* présente un faible polymorphisme génétique. En effet, il a été montré que les souches isolées appartenant à cette espèce étaient quasi clonales par analyse de la séquence du gène GyrB qui code une hélicase. De plus, cette bactérie a été isolée dans l'environnement de type estuarien (eau de mer), mais également à partir d'hémolymphe de *C. gigas*, seul hôte de *V. aestuarianus* connu à ce jour. Sa pathogénicité pour *C. gigas* a été confirmée en infection expérimentale par injection dans le muscle adducteur de  $10^8$  CFU par individu ; la souche 02/041 présente une forte virulence vis-à-vis de l'huître creuse, puisqu'elle induit un taux de mortalité de l'ordre de 90% à 7 jours post-infection (Labreuche, 2006). Toutes les souches de *Vibrio aestuarianus* étudiées jusqu'à présent apparaissent pathogènes pour l'huître et sécrètent une métalloprotéase (Saulnier *et al.*, *in prep*).

### II.3. Gestion des mortalités en ostréiculture

On l'a dit, la virulence/pathogénicité est influencée par l'environnement. Par ailleurs, et indépendamment de la présence de pathogènes, le phénotype de l'huître est lui-même le produit de l'interaction entre son génotype, et son environnement d'élevage. Parmi les trois compartiments hôte, pathogène et environnement, l'aquaculteur soucieux de la santé de son cheptel tente d'agir généralement sur les compartiments hôte et environnement (au sens large du terme), le compartiment pathogène étant peu contrôlable.

Autrement dit, seuls deux types de stratégies sont à envisager pour tenter de gérer les pathologies : il s'agit soit de gérer différemment l'environnement d'élevage au sens large (c'est-à-dire l'environnement biologique, physico-chimique et technique dans lequel le cheptel se développe et croît, ce qui peut correspondre à une action indirecte sur l'hôte ou sur le pathogène), soit de sélectionner au sein du cheptel les génotypes les plus adaptés pour répondre aux agressions de l'environnement et plus spécifiquement à la présence des pathogènes.

#### II.3.1. Action sur l'environnement d'élevage

Dans le but de contrôler l'environnement dans lequel se trouve l'huître, des solutions seraient possibles, mais elles présentent des inconvénients propres à la situation d'élevage des huîtres en milieu ouvert.

En effet, l'utilisation d'antibiotiques est impossible compte tenu de la législation de plus en plus contraignante et surtout à cause du type de milieu (ouvert et non-contrôlé). L'utilisation de probiotiques est comme pour les antibiotiques, peu conseillée et n'est pas adaptée au milieu ouvert. Ensuite, la réalisation d'un élevage d'huître sans pathogène, c'est-à-dire dans un milieu entièrement stérile, est inconcevable en terme de coût et de raisons pratiques. Plus généralement, le coût économique des traitements, leur répercussion en terme d'image du produit et leurs possibles effets sur l'environnement et/ou la santé des consommateurs sont autant d'incitations à explorer d'autres méthodes de protection de la santé des élevages (Quillet *et al.*, 2007).

Une gestion zootechnique à l'échelle de l'élevage peut être envisagée, en modifiant les pratiques traditionnelles de l'ostréiculture. Par exemple, la propagation des agents infectieux pourrait être diminuée en réduisant les densités d'animaux en élevage. Un suivi des pathogènes pourrait également être instauré au niveau des écloseries qui paraissent être un milieu d'élevage propice à leur développement. Une meilleure traçabilité des lots, et une réduction des transferts inter-bassins permettrait finalement de limiter la propagation des pathologies.

Enfin, la solution d'une action directe sur l'environnement d'élevage afin d'augmenter la résistance des huîtres à un pathogène est certainement la solution de gestion des mortalités la plus pratiquée. L'élevage d'huîtres sur des sites de haut niveau trophique permet une meilleure condition physiologique des huîtres qui leur confère un meilleur potentiel de résistance à une infection (Samain et McCombie, 2007). De la même manière, les élever à une faible température permet d'empêcher une ponte totale des huîtres, et limite donc le stress physiologique lié à l'émission gamétique. Le décalage des zones d'élevage de l'huître creuse vers le nord (pré-grossissement en Bretagne, Normandie ou Irlande) traduit cette tendance d'optimisation des schémas de production (Samain et McCombie, 2007).

#### II.3.2. Amélioration génétique de l'huître

Le rendement de production de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, est variable. Ceci peut être expliqué par le fait que, contrairement à la plupart des espèces d'intérêt agricole, l'huître creuse cultivée est une espèce génétiquement « sauvage » qui est cultivée dans son milieu naturel. Les stocks cultivés sont

directement issus de la sélection naturelle et non des souches domestiquées (Boudry, 2003), la domestication étant définie comme l'ensemble des pressions de sélections générées par l'homme sur une espèce d'intérêt agricole pour améliorer son rendement de production (Taris, 2005). La domestication de cette espèce par l'amélioration génétique permettrait alors de s'orienter vers une ostréiculture durable. En effet, des voies d'amélioration du rendement, à savoir des performances de croissance, de la survie et de la qualité de l'huître creuse, sont explorées. C'est pourquoi des études visant à optimiser les performances de *C. gigas* se sont orientées vers la gestion de la variabilité génétique, la sélection génétique et la triploïdie.

#### II.3.2.1. Gestion de la variabilité génétique

De nombreuses études portant sur les espèces d'intérêt aquacole montrent la perte de variabilité qu'ont subie les populations d'élevage reproduites à partir de stocks fermés par rapport à leurs populations sauvages d'origine (Sbordoni *et al.*, 1986 ; Sunden et Davis, 1991) ; cette perte de variabilité correspond à une augmentation de la consanguinité dans ces populations domestiquées. Parallèlement, on a pu montrer chez les mollusques et chez les crustacés la corrélation entre hétérozygotie et croissance d'une part, et entre niveau de consanguinité et survie en élevage d'autre part (Bierne *et al.*, 2000 ; Crocos *et al.*, 2000). La gestion de la variabilité des stocks aquacoles constitue donc une priorité, en particulier dans le cas d'espèces introduites sans véritables considérations génétiques durant la phase pionnière de développement (Quillet *et al.*, 2007). La réintroduction de « sang neuf » constitue une option dont il convient d'étudier les modalités (en particulier réintroduction d'individus sauvages ou réintroduction d'individus domestiqués issus de populations différentes) et les conséquences potentielles en tenant compte des risques sanitaires associés (Goyard *et al.*, 2003).

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

- l'huître creuse présente un fort fardeau génétique qui contribue à l'expression de la dépression de consanguinité lors de croisements impliquant un petit nombre de géniteurs (Bierne *et al.*, 2000).
- les pratiques d'élevages tendent éroder la diversité génétique initiale (effet du tamisage sélectif sur la taille en élevage larvaire, Taris, 2005).

#### II.3.2.2. Sélection génétique

*Crassostrea gigas* est une espèce sauvage, et sa domestication est un objectif majeur des programmes d'amélioration génétique. La sélection génétique consiste à sélectionner des géniteurs présentant des caractères d'intérêt et de s'assurer de la transmission de ceux-ci à la descendance. De nombreux travaux sont en cours pour déterminer s'il existe une variabilité génétique pour des caractères d'intérêt aquacole et s'il existe des possibilités de sélection pour ces caractères (Boudry, 2003). Or les caractères contrôlant le rendement de production aquacole sont pluri-alléliques, leur expression dépend de la valeur génétique des parents, des effets de l'environnement et de leurs éventuelles interactions.

Cette notion est traduite dans la formule suivante :  $VP = VG + VE + VG \times VE$  (avec **VP** : variance phénotypique, **VG** : variance génétique et **VE** : variance environnementale).

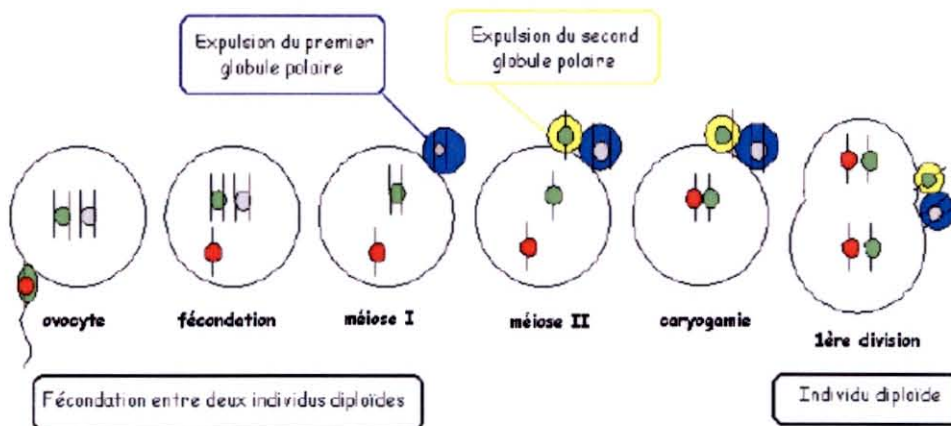
La faisabilité d'une sélection sur les caractères d'intérêt est testée par l'analyse conjointe de l'appartenance familiale d'un individu et de son trait phénotypique, la corrélation entre les deux renseignant sur le déterminisme génétique du trait. La production en écloserie de familles à partir de géniteurs identifiés, et les méthodes d'assignation de parenté par marqueurs moléculaires ont permis un développement rapide

de cette voie de recherche chez l'huître creuse. Chez l'huître creuse diploïde, de fortes héritabilités sont observées pour les caractères d'intérêts comme par exemple la survie et la croissance (Boudry *et al.*, 2006).

### II.3.2.3. Triploïdie

La polyploïdisation consiste à ajouter un ou plusieurs jeux haploïdes de chromosomes à un génome diploïde. Le génome de base d'un organisme est caractérisé par le nombre de chromosomes non homologues contenu dans le noyau d'une cellule (par exemple 23 chez l'Homme et 10 chez l'huître). La plupart des individus du règne animal sont généralement diploïdes (Figure 4). Leur génome est constitué de la fusion des génomes haploïdes d'origine maternelle et paternelle lors de la fécondation (Haure *et al.*, 2003). Les méthodes d'induction de la triploïdie consistent à augmenter la contribution de l'un ou l'autre des parents qui fournira alors 2 jeux de chromosomes haploïdes à la descendance.

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



**Figure 4 : Schéma de développement de l'œuf d'un organisme diploïde (2N)**  
(Haure *et al.*, 2003)

Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* la triploïdie a été induite dès la fin des années 80 (Nell, 2002) et les huîtres triploïdes rencontrent un succès croissant en ostréiculture, représentant 50 à 60% des huîtres consommées en France en 2007 (J. Normand, communication personnelle). Cette manipulation du matériel chromosomique permet une croissance plus rapide de l'animal, une meilleure survie ainsi qu'une réduction forte mais variable de l'effort de reproduction (Normand *et al.*, *in prep.*). Par conséquent, le rendement des huîtres triploïdes est supérieur à celui de leurs équivalents diploïdes. La réduction de la gamétogenèse permet également une meilleure commercialisation de ces huîtres pendant la période de reproduction des diploïdes (qui sont qualifiées de « laiteuses »), et limite leur propagation dans l'environnement naturel (Normand *et al.*, *in press*). Mais en ce qui concerne les organismes triploïdes, la littérature laisse présager d'une amélioration génétique plus complexe (Normand *et al.*, 2008). Par exemple, chez les salmonidés, une interaction entre la ploïdie de la descendance et les valeurs génétiques des parents a été démontrée, c'est à dire que les valeurs des traits phénotypiques de la descendance ne sont pas strictement la résultante des valeurs génétiques des parents (Blanc *et al.*, 2001). La sélection de géniteurs diploïdes présentant des

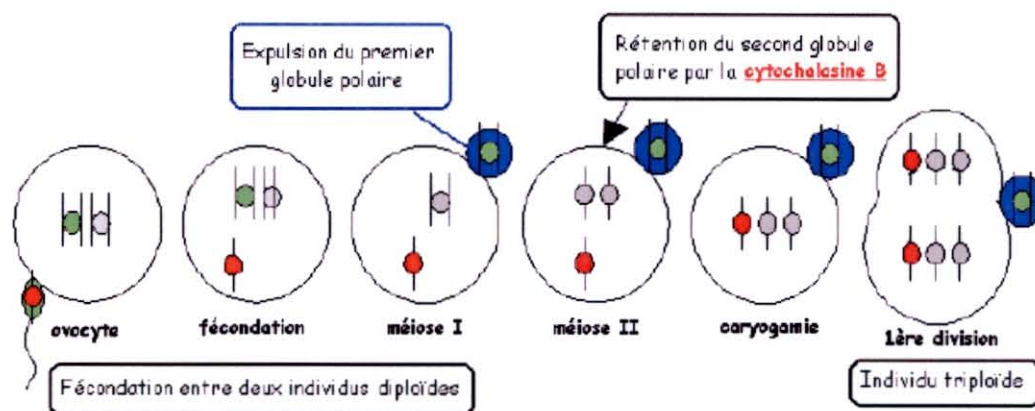


caractères d'intérêt ne permet donc pas de s'assurer de la transmission de ceux-ci à la descendance triploïde. Dans le cas où la triploïdie impacte la valeur du trait phénotypique sélectionné indépendamment de la valeur génétique des parents, il deviendrait donc nécessaire de choisir les futurs reproducteurs diploïdes sur la base des résultats de leur descendance triploïde elle-même (ou d'équivalents triploïdes) (Blanc et Vallée, 1999).

Différentes techniques permettent l'obtention d'individus triploïdes, qui possèdent trois jeux de chromosomes haploïdes ( $3n$ ). Les huîtres triploïdes peuvent être obtenues par induction chimique ou par croisement.

- Induction par voie chimique

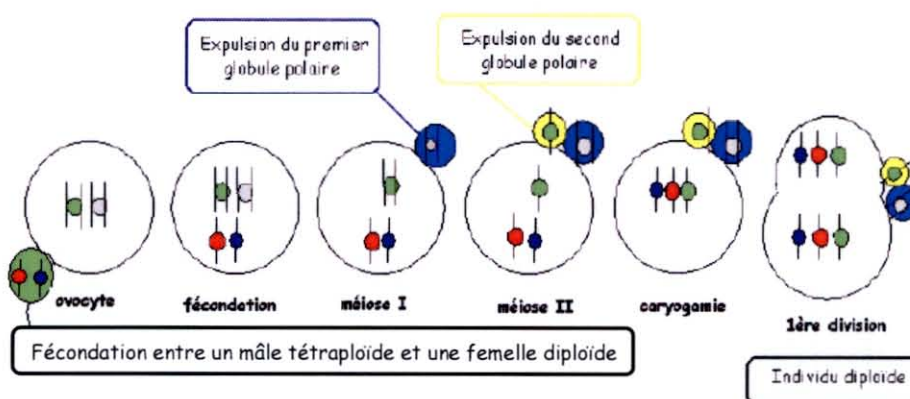
La cytochalasine B est un inhibiteur qui permet la rétention d'une paire de chromosomes se trouvant dans le globule polaire, lors de la division de l'œuf. Il est possible d'obtenir des huîtres triploïdes par rétention du premier ou du deuxième globule polaire. Cependant, la rétention du deuxième globule polaire (ce qui correspond à l'inhibition de la méiose II, Figure 5) est utilisée préférentiellement puisqu'elle se traduit par de meilleures performances (survie et croissance) des élevages larvaires. Les individus ainsi obtenus sont dits « triploïdes chimiques » ( $3nc$ ). La triploïdie peut également s'obtenir par l'inhibition de premier ou du second globule polaire avec le 6-diméthylaminopurine (6-DMAP) (Beaumont et Fairbrother, 1991).



**Figure 5 : Inhibition du second globule polaire par la cytochalasine B permettant d'obtenir un individu triploïde ( $3N$ ).**  
(Haure et al., 2003)

- Obtention par croisement

Les individus triploïdes peuvent aussi être obtenus par croisement entre un mâle tétraploïde ( $4n$ ) et une femelle diploïde ( $2n$ ) (Figure 6). Les individus obtenus sont dits « triploïdes naturels » ( $3nn$ ) (Beaumont et Fairbrother, 1991).



**Figure 6 : Représentation schématique de l'obtention d'un œuf triploïde ( $3N$ ) par croisement entre un mâle tétraploïde ( $4N$ ) et une femelle diploïde ( $2N$ )** (Haure et al., 2003)

### III- MATERIEL ET METHODES

---

#### **III.1. Matériel biologique et infections expérimentales**

##### III.1.1. Les huîtres, *Crassostrea gigas*

Les huîtres utilisées lors de cette étude ont été obtenues par croisement expérimental (réalisé en avril 2006), et élevées dans les mêmes conditions. Il s'agit de deux lots composés respectivement d'animaux diploïdes (2N) et de triploïdes issus d'induction chimique (3Nc). Tous les lots ont été produits par le croisement d'une même femelle diploïde avec 16 mâles diploïdes (lots 2N et 3Nc).

Dans le cadre de la thèse de Sophie de Decker, quatre infections expérimentales successives ont été réalisées sur ces animaux présentant des stades de reproduction différents (début gamétogenèse, mature, post-ponte, repos hivernal) entre Mai 2007 et Janvier 2008 (Tableau 1). Les infections ont été réalisées par injection dans le muscle adducteur d'un mélange de *Vibrio splendidus* et *Vibrio aestuarianus*. Deux doses infectantes ont été injectées : une dose forte de  $10^7$  bactéries injectées par individu et une dose qualifiée de faible de  $10^6$  bactéries par individu. Les animaux « témoins » sont injectés avec de l'eau de mer artificielle stérile (afin de reproduire l'effet de l'injection, mais sans le pathogène). Les huîtres sont ensuite maintenues dans des aquariums de 5L munis d'un système de bullage, en eau stagnante régulée à 20°C. Le suivi de l'infection s'effectue sur une durée de 5 à 7 jours au cours desquels une surveillance régulière est effectuée afin de décompter les huîtres mortes caractérisées à la fois par une absence de tonicité musculaire et l'observation de valves entrebâillées.

Les survies obtenues pour chaque lot diploïde et triploïde à 120h post-infection à l'issue de ces quatre infections expérimentales sont analysées. De plus, différents types d'échantillons ont été prélevés sur les huîtres testées et caractérisées au cours de ces quatre infections pour l'analyse des différents facteurs influençant la sensibilité de l'huître. Ces échantillons ont été conservés dans les conditions adéquates pour les analyses envisagées.

Le tableau 1 fait la synthèse d'une part des effectifs des animaux survivants à 120h post-infection, d'autre part des échantillons de tissus disponibles et de leurs caractéristiques. L'ensemble des travaux de ce stage a été effectué à partir des données et des échantillons issus de ces expérimentations.

**Tableau 1 : Tableau récapitulant les principales caractéristiques des infections expérimentales et les analyses effectuées au cours du stage.**

2N : diploïde, 3Nc : triploïde chimique

TEMA : Témoin injecté avec de l'Eau de Mer Artificielle, TNI : Témoin Non-Injecté

	TISSUS UTILISES	1	2	3	4
<b>DATES D'INFECTION</b>	-	<b>06/05/2007</b>	<b>05/07/2007</b>	<b>30/08/2007</b>	<b>18/01/2008</b>
<b>PLOÏDIE</b>	-	2N	2N et 3Nc	2N et 3Nc	2N et 3Nc
<b>RESULTAT DES INFECTIONS EXPERIMENTALES (à 120h post-injection)</b>	-	50 survivantes sur 125 au total	2N : 39 survivantes sur 96 au total 3Nc : 41 survivantes sur 97 au total	2N : 64 survivantes sur 121 au total 3Nc : 77 survivantes sur 115 au total	2N : 61 survivantes sur 135 au total 3Nc : 61 survivantes sur 91 au total
<b>STADE DE MATURITE GONADIQUE</b>	-	<b>début de la gamétogénèse</b>	<b>mature</b>	<b>post-ponte</b>	<b>repos hivernal</b>
<b>AGE (en mois)</b>	-	10	12	13	18
<b>INDICE DE CONDITION (IC)</b>	huître entière	2N : 30 individus	2N : 30 individus	2N : 30 individus	2N : 30 individus
			3Nc : 30 individus	3Nc : 29 individus	3Nc : 30 individus
point en plus réalisé le 05-06-2007 2N : 30 individus					
<b>OCCUPATION GONADIQUE</b>	coupe transversale des huîtres (2N)	mortes : 33 individus TEMA : 26 individus	mortes : 33 individus TNI : 30 individus	mortes : 34 individus	témoins : 14 individus
				TEMA : 8 individus	
				survivantes : 35 individus	
<b>IMMUNO-HISTOLOGIE</b>	coupe transversale des huîtres	5 huîtres matures : 4 infectées par balnéation avec TR32+ 1 témoin non-infectée			
<b>GENOTYPAGE</b>	bout de branchie	-	-	2N : 68 mortes + 79 survivantes	-
				3Nc : 57 mortes + 82 survivantes	

### III.1.2. Les Vibrio

Deux souches ont été utilisées lors des infections expérimentales : *V. splendidus* TR32, correspondant à la souche LGP32 mutée afin d'exprimer une protéine fluorescente (Green Fluorescence Protein) (Le Roux, 2007) et *V. aestuarianus* 02/041 (Garnier *et al.*, 2007). De plus, la souche Double Delta VSM 509+2989, mutée également à partir de LGP32, a été utilisée lors du stage. Le tableau 2 résume les principales caractéristiques de ces différentes souches.

**Tableau 2 : Principales caractéristiques des souches utilisées.**

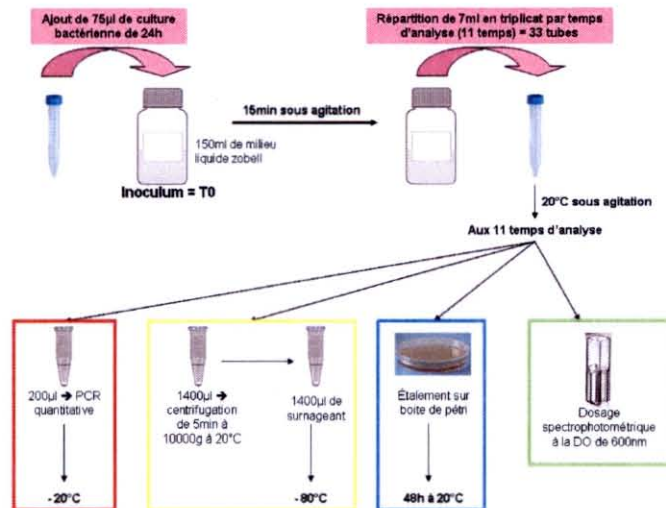
NOM	TYPE	ISOLEMENT	MUTATION	INTERETS DE LA MUTATION
<u>LGP32</u>	sauvage	en 2001, dans un contexte de mortalité estivale d'huître creuse lors d'expérimentations réalisées en aquarium	-	-
<u>TR32</u>	mutée à partir de LGP32	-	insertion d'un gène codant une protéine fluorescente en vert (la Green Fluorescence Protein), ainsi qu'un gène codant une acétyl-transférase (CAT) I	la GFP la rend détectable en microscopie à épifluorescence et la CAT lui confère une résistance à un antibiotique, le chloramphénicol.
<u>Double Delta VSM 509+2989</u>	mutée à partir de LGP32	-	délétion de la partie centrale des deux gènes codant deux métalloprotéases	ne présente plus aucune activité métalloprotéase et constitue donc un témoin d'intérêt pour nos expérimentations.
<u>O2/041</u>	sauvage	en 2002, durant la période estivale, à partir d'hémolymphe d'huître prélevée dans l'écloserie d'Argenton	-	-

### **III.2. Les outils de caractérisation des Vibrio**

#### III.2.1. Quantification de *Vibrio splendidus* et *Vibrio aestuarianus*

##### III.2.1.1. Préparation des cultures bactériennes et des échantillons

Les cultures bactériennes de *Vibrios splendidus* et *Vibrio aestuarianus* sont préparées en inoculant 7ml de milieu Zobell liquide (ou Marine Broth) en ensemençant avec trois colonies dans un tube de culture de 15ml. Les deux Falcons sont alors placés à 20°C pen dant 24h sur un agitateur rotatif. Après 24h de culture, un étalement sur boîte de Marine Agar d'une dilution appropriée de la suspension est réalisé afin de vérifier la concentration de la suspension ( $10^9$  bactéries/ml théorique en phase de plateau). Pour la suite de l'expérience, la totalité des étapes est réalisée pour les deux souches (TR32 et 02/041) en parallèle, et est représentée sur la figure 7.



**Figure 7 : Schéma représentant la préparation des cultures bactériennes et des échantillons pour la quantification en PCR quantitative et pour la mesure de l'activité métalloprotéase.**

Remarque : ce protocole a été suivi pour les deux souches bactériennes étudiées : TR32 et 02/041

Plusieurs points d'analyse sont effectués à partir de l'inoculum, à savoir 3h (T1), 5h (T2), 7h (T3), 9h (T4), 10h30min (T5), 12h (T6), 16h (T7), 20h (T8), 24h (T9), 45h (T10) et 141h30min (T11) après le T0.

### III.2.1.2. Construction des courbes de croissance

#### III.2.1.2.1. Dosages spectrophotométriques et comptages sur boîte

A chaque point d'analyse, une mesure spectrophotométrique est réalisée en triplicat à l'aide du spectrophotomètre BioPhotometer d'Eppendorf à la DO de 600nm. Un étalement sur boîte de Pétri est également réalisé pour une estimation de la concentration.

Les courbes de croissance classiques peuvent alors être établies pour chaque souche bactérienne par représentation soit de la densité optique soit des comptages des colonies sur boîte en fonction de l'âge de la culture.

#### III.2.1.2.2. Quantification des souches bactériennes par PCR quantitative

Avant de pouvoir quantifier les échantillons prélevés lors du suivi de croissance (voir III.2.1.1.) il est nécessaire de construire une gamme étalon pour chaque souche bactérienne, *V. splendidus* et *V. aestuarianus*.

Pour cela, des gammes de dilution de 10 en 10 sont réalisées dans un volume de 1ml à partir de bouillons de culture en phase de plateau (de moins de 24 heures de concentration théorique connue,  $10^9$  bactéries par ml). Une estimation de la concentration de la suspension est effectuée par la méthode classique du comptage sur boîte. 900µl de suspension pour les différents points de la gamme de dilution sont centrifugés 5min à 20°C à 10000g, les culots sont ensuite repris dans 900µl d'H<sub>2</sub>O Sigma et vortexés. 100µl de ces solutions sont bouillis 10min à 98°C, pour extraire l'ADN et le dénaturer. 5µl de ces échantillons sont utilisés pour la PCR quantitative.

Ce protocole d'extraction est appliqué de façon similaire aux échantillons correspondant à l'étude de la croissance bactérienne.

La PCR quantitative, réalisée avec un Mx3000P™ de Stratagene®, est réalisée à l'aide d'une sonde marquée spécifique des souches que l'on cherche à quantifier et qui utilise la chimie Taqman. La séquence des amorces et des sondes ainsi que le protocole d'amplification ont été mis au point au laboratoire. Les gènes ciblés sont : le gène codant la GFP inséré par mutagenèse chez la souche *V. splendidus* TR32 et le gène dnaJ d'intérêt phylogénétique (Nhung et al., 2007) concernant la souche *V. aestuarianus* 02/041. 5µl

d'ADN sont amplifiés dans un volume total de 25µl. Les concentrations finales des différents composants de la PCR sont les suivantes : 1X Core PCR Buffer, MgCl<sub>2</sub> à 5mM, les dNTP à 0,8mM, les deux amorces à 300nM et la sonde à 200nM (dont les séquences sont décrites dans le tableau 3) et la Hot start Taq polymérase utilisée à 0,05U/µl. La réaction d'amplification se déroule suivant ce profil thermique : dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 10min suivie de 40 cycles à deux phases, 15sec à 95°C puis 90sec à 60°C.

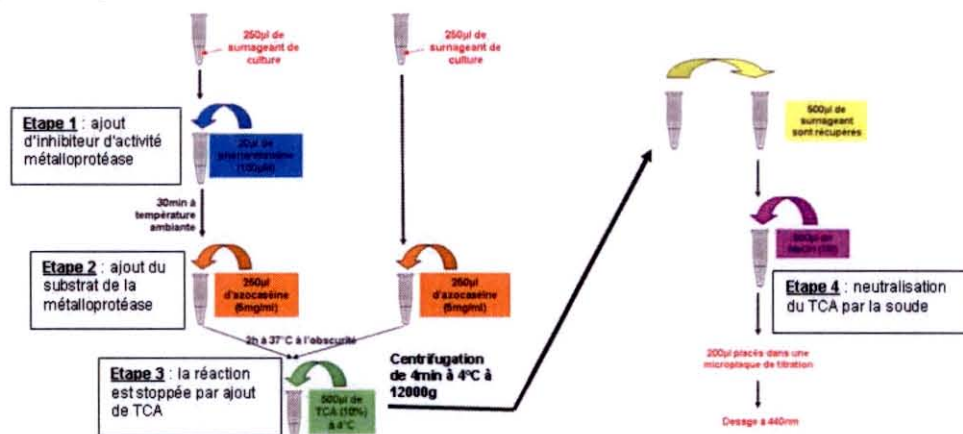
**Tableau 3 : Description des amorces et des sondes utilisées pour la quantification de *Vibrio splendidus* TR32 et *Vibrio aestuarianus* 02/041 en PCRq.**

Souche	Oligonucléotides	Fonction	Séquence	Température d'appariement (°C)	Taille des produits PCR (pb)
<i>V. aestuarianus</i> 02/041	dnaJ	Amorce Sens Taqman	GTATGAAATTTTAACTGACCCACAA	58,48	267
		Amorce Anti - Sens Taqman	CAATTCCTTTCGAACAACCAC	59.11	
		Sonde Taqman	TGGTAGCGCAGACTTCGGCGAC	70,91	
<i>V. splendidus</i> TR32	GFP	Amorce Sens Taqman	TCAGTGGAGAGGGTGAAGGT	59.68	194
		Amorce Anti - Sens Taqman	TACATAACCTTCGGGCATGG	60.71	
		Sonde Taqman	TGTTCCATGGCCAACACTTGTC	67.89	

### III.2.2. Mesure de l'activité métalloprotéase

500µl de surnageant de culture, stockés à -80°C, sont utilisés pour mesurer l'activité métalloprotéase aux différents points de la courbe de croissance. Après avoir suivi le protocole de la figure 8, 200µl de la solution finale sont placés dans une microplaque de titration pour mesurer l'absorbance à 440nm, à l'aide d'un lecteur à plaque « Multiskan Ex » (Thermo electron Corporation) et du logiciel « Ascent Software V2.6 ». Une courbe d'activité métalloprotéase est alors obtenue à l'aide du logiciel « Excel ».

En parallèle, différentes cultures bactériennes sont préparées selon Denkin et Nelson (2004), afin de tester l'effet du surnageant de la souche mutée Double Delta VSM 509+2989 sur la production de métalloprotéase par la souche TR32.



**Figure 8 : Protocole de mesure de l'activité métalloprotéase dans les surnageants de culture.**

Azocaséine : concentration de 2,5mg/ml finale dans du Tris 50mM pH 8

TCA : Trichloroacétate

### III.2.3. Immuno-histologie

#### III.2.3.1. Réalisation des lames d'histologie

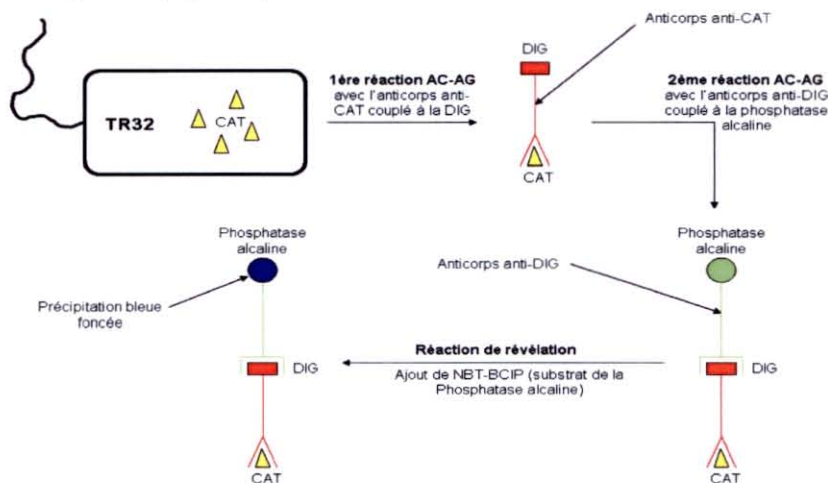
Cinq huîtres matures ont été utilisées pour cette expérience. Quatre provenaient d'animaux moribonds (48 h post infection) placés dans un aquarium où une suspension bactérienne de TR32 a été artificiellement ajoutée. La cinquième, non-infectée par balnéation, est utilisée comme témoin. Ces cinq individus ont été fixés dans une solution de type Davidson pendant 48h puis transférés dans de l'alcool 70%.

Pour chacune de ces cinq huîtres, une tranche médiane, passant par différents tissus (masse viscérale, branchies, manteau et muscle) est réalisée et placée dans une cassette histologique conservée pendant quelques jours dans du Davidson puis transférée dans de l'alcool 70°. Elle subit ensuite la mise en bloc de paraffine et la réalisation des coupes, comme précédemment (partie III.3.2.).

Pour chaque individu, trois coupes de 5µm, espacées de 100µm, sont effectuées à l'aide d'un microtome (Retracting Microtome, Rotary-one de LKB BROMMA) et déposées sur des lames silanisées (Silane-Prep Slides, SIGMA).

#### III.2.3.2. Réactions d'immuno-histologie

Il s'agit d'une réaction anticorps-antigène, qui cible spécifiquement la protéine intervenant dans les mécanismes de résistance au chloramphénicol, la Chloramphénicol Acétyltransférase (CAT), dont le gène a été inséré par mutagenèse (Figure 9).



**Figure 9 : Immuno-révélation de l'antigène Chloramphénicol AcétylTransférase de la souche mutée *V. splendidus* TR32 responsable de la résistance au chloramphénicol.**

CAT : Chloramphénicol Acétyltransférase ; DIG : Digoxigénine ; NBT : Nitro Blue Tetrazolium Chloride ; BCIP : 5-Bromo-4-Chloro-3- Indolyl Phosphate

Pour ce faire, deux lames par individu ainsi qu'une lame témoin (montée à partir des tissus d'un individu infecté par balnéation) sont utilisées. Sur la lame témoin sont réalisées toutes les étapes sauf la première réaction anticorps-antigène (avec l'anticorps anti-CAT). Les différentes étapes de ces réactions sont répertoriées dans le tableau 4.

**Tableau 4 : Etapes des réactions d'immuno-histologie.**

CAT : Chloramphénicol AcétylTransférase ; DIG : Digoxigénine ; NBT : Nitro Blue Tetrazolium Chloride ;  
BCIP : 5-Bromo-4-Chloro-3- Indolyl Phosphate

ETAPE	APPLICATION	TEMPS	PRODUIT	OBJECTIF
1	2 bains	10min	xylène	déparaffinage des lames
2	2 bains	10min	éthanol absolu	
3	1 bain	30min	Blocking Reagent dissout dans du TBS 1X	saturation des sites non-spécifique à la réaction
4	gouttes	30min	anticorps anti-CAT (0,2mg/ml, épuisé avec un bouillon de la souche LGP32 de <i>V. splendidus</i> et filtré à 0,22µm)	1ère réaction anticorps-antigène (sur toutes les lames sauf celle utilisée comme témoin)
5	3 bains	10min	TBS 1X (Tris-base 50mM, NaCl 50mM, pH=7,6)	lavage
6	1 bain	30min	anticorps anti-DIG (épuisé avec un bouillon de la souche LGP32 de <i>V. splendidus</i> et filtré à 0,22µm)	2ème réaction anticorps-antigène (sur toute les lames)
7	2 bains	10min	TBS 1X (Tris-base 50mM, NaCl 50mM, pH=7,6)	lavage
8	1 bain	10min	tampon substrat (Tris-base 100mM, MgCl <sub>2</sub> 50mM et NaCl 100mM)	
9	1 bain	2h	NBT (75mg/ml), du BCIP (50mg/ml) et du tampon substrat	révélation
10	1 bain	10min	H2O distillée	stopper la réaction et lavage
11	-	24h	-	séchage
12	1 bain	5min	Jaune de Bismarck	coloration des tissus
13	1 bain	1min	éthanol 70°	-
14	2 bains	1min	éthanol absolu	
15	2 bains	1min	xylène	
16	-	-	-	montage des tissus entre lame et lamelle à l'aide d'une résine

### III.2.3.3. Analyse en microscopie à lumière blanche

Chaque lame est ensuite observée au microscope en balayant la totalité des tissus à la recherche de signaux de couleur bleue foncée en forme de petits bâtonnets, marqueurs de la présence de *Vibrio* ou de foyers bactériens.

### III.3. Outils de description de l'huître *Crassostrea gigas* (hôte)

Dans la mesure où la littérature suggère que la réponse des huîtres à une infection expérimentale est susceptible d'être influencée par de nombreux facteurs, une campagne de testage a été entreprise afin de pondérer la réponse à l'infection expérimentale (survie) par l'état physiologique (reproduction et croissance) des individus d'une part et par la ploïdie d'autre part.

#### III.3.1. Pesées

Des mesures de matières sèches sont réalisées sur des lots de 30 huîtres de ploïdie (2N, 3Nn et 3Nc) et de date d'infection différentes (Tableau 1). Les animaux ont d'abord été sélectionnés aléatoirement, ils ont ensuite été ouverts et des pesées séparées de coquille égouttée et de chair fraîche égouttée ont été



effectuées. Les chairs égouttées sont ensuite déshydratées à l'étuve pendant environ 60 heures et à 60°C. La chair sèche de chaque individu est enfin pesée et l'IC calculé.

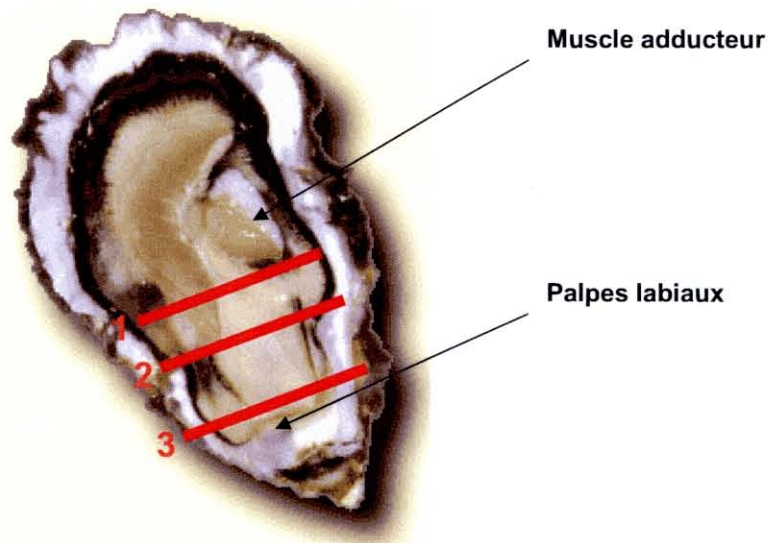
L'indice de condition (IC) de Walne et Mann (Normand *et al.*, 2008) de l'animal peut être calculé grâce à la formule suivante:

$$IC = (masse\ de\ chair\ sèche(g) \times 1000) / masse\ de\ coquille(g)$$

### III.3.2. Stades de maturité sexuelle et occupation gonadique.

Aux quatre dates d'infections expérimentales (Tableau 1), différents lots d'huîtres diploïdes mortes, survivantes et témoins (TEMA : Témoin injecté avec de l'Eau de Mer Artificielle, TNI : Témoin Non-Injecté) vont être utilisés pour cette analyse.

L'histologie a pour objectif d'obtenir des coupes minces de tissus de l'animal observables au microscope photonique après coloration. Après ouverture des huîtres, les chairs sont placées dans du fixateur Davidson (1500ml d'eau de mer, 500ml de glycérol, 1000ml de formol, 1500ml d'éthanol et 250ml d'acide acétique). Cela va permettre de maintenir les échantillons dans un état aussi proche que possible de leur état *in vivo*. Les huîtres sont ensuite affranchies de tous leurs tissus inutiles pour la suite de l'analyse, à savoir les branchies et le manteau, pour dégager la masse viscérale. Trois tranches sont alors découpées dans cette dernière, selon un plan de coupe bien précis, décrit sur la figure 10. En effet, la première est réalisée après le muscle, la deuxième au milieu de la masse viscérale et enfin la troisième en dessous des palpes labiaux. Enfin, ces trois tranches sont chacune disposées dans une cassette d'histologie puis baignées dans de l'éthanol 70°.



**Figure 10 : Description des positions des trois coupes réalisées sur les huîtres.**

- Position 1 : après le muscle ;
- Position 2 : au milieu de la masse viscérale ;
- Position 3 : avant les palpes labiaux.

Après la fixation, les tissus sont inclus dans de la paraffine. Pour ce faire, les cassettes contenant les tranches d'huître sont placées dans un automate à déshydratation-inclusion (TISSUE-TEK® VIP), afin de remplacer l'eau contenue dans les tissus par le milieu d'inclusion (paraffine). A l'issue de l'imprégnation des tissus dans la paraffine, les échantillons sont récupérés pour être inclus manuellement dans de la paraffine. Pour cela, chaque tranche de masse viscérale est retirée de la cassette pour la déposer dans des « moules » à paraffine que l'on remplit de paraffine liquide à l'aide d'un distributeur (Dispensing Console de TISSUE-TEK®). Au sommet de chaque godet est placée la cassette correspondant à la tranche de l'animal et le tout

est laissé pendant quelques minutes sur un support froid (Cryo-Console de TISSUE-TEK®) pour faire durcir la paraffine.

Avant de réaliser des coupes, il est nécessaire de dégrossir les blocs de paraffine. Cette étape est effectuée au microtome (Retracting Microtome, Rotary-one de LKB BROMMA) et consiste à mettre à nu les tissus qui affleurent. Des coupes de 5 µm sont ensuite réalisées. Ces dernières sont enfin déposées sur une lame histologique.



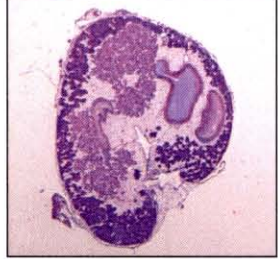
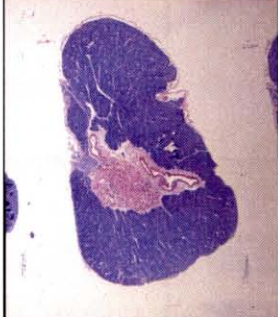

La coloration des tissus se fait à l'hématoxyline-éosine et en plusieurs étapes, répertoriées dans le tableau 5. Une lamelle fine va être apposée sur la lame colorée, le montage étant réalisé à l'aide de résine (Eukitt®). La lame montée va ensuite solidifier pendant 24 heures, empêchant ainsi le dessèchement des tissus et assurant l'adhérence de la lamelle sur la lame.

**Tableau 5 : Les étapes de la coloration par l'hématoxyline et l'éosine des tissus.**

ETAPES	REPETITION	TEMPS	BAINS	BUT
1	2	15min	xylène	déparaffinage des coupes
2	2	15min	éthanol absolu	élimination du xylène
3	1	5min	eau courante	réhydratation des tissus
4	1	1min30sec	hématoxyline	coloration des structures nucléaires en une teinte bleue à violet foncé, des ergastoplasmes en bleu et des cytoplasmes en gris
5	1	5min	eau courante	élimination du surplus de colorant
6	1	4min30sec	éosine	coloration de toutes les structures acidophiles en rose
7	3	1min	éthanol absolu	
8	2	1min	xylène	

Les lames histologiques ainsi montées sont numérisées à l'aide d'une caméra montée sur une loupe binoculaire et le logiciel « analySIS ». Ces images numérisées vont servir à déterminer le stade de maturité sexuelle de chaque huître, d'après la classification de Mann (1979) (Tableau 6). De plus, le logiciel d'analyse d'image « IMAQ™ Vision Builder » (National Instrument) va être utilisé pour estimer l'effort reproducteur en effectuant le rapport entre la surface de la gonade et la surface totale de la masse viscérale.

**Tableau 6 : Classification des stades de gamétogenèse d'après Mann (1979)**

STADE	ACTIVITE	DESCRIPTION HISTOLOGIQUE	EXEMPLE
0	Repos sexuel	absence totale de tissu gonadique ; les follicules ne sont pas présents ou sont étirés et sont composés de cellules germinales non différenciées	
1	maturation précoce	follicules de petite taille contenant des ovogonies ou des spermatogonies	
2	gamétogénèse	développement des follicules contenant désormais des ovocytes ou des spermatocytes	
3	mature	les follicules sont entièrement remplis de gamètes matures	
4	Post-ponte et atresie	follicules déformés et dégénérescence des gamètes non-émis	

### III.3.3. Contrôle de la ploïdie par cytométrie en flux

Cette technique consiste à mesurer la fluorescence émise par une solution de noyaux libres colorés au DAPI (fluorochrome spécifique de l'ADN : 4,6-Diaminido-2-phénylindol) à l'aide d'un cytomètre en flux (Partec, PAII). Cette émission est proportionnelle à la quantité de matériel chromosomique contenue dans les noyaux cellulaires et donc à la ploïdie de l'individu.

Ce diagnostic a été réalisé régulièrement sur un sous-échantillon de 100 huîtres par lot, pour les 2 lots triploïdes afin de certifier la non-réversion des huîtres 3n vers l'état 2n. Pour cela 1mm<sup>2</sup> de feuillet branchial a été prélevé sur les individus anesthésiés. 1ml de tampon d'extraction (tampon cyto = MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O + NaCl + Tris + H<sub>2</sub>O bi-distillée + HCl pour avoir le pH à 7) est ajouté au prélèvement. La suspension de

noyaux libres est ensuite filtrée sur une maille de 30µm et complétée par 1ml de tampon d'extraction auquel ont été ajouté le fluorochrome DAPI (1µg/ml) ainsi que le témoin interne TRBC coultter (solution standard d'hémocytes de truites, 2µl/tube). Les échantillons ainsi préparés sont placés sur de la glace et à l'obscurité, et peuvent être analysés après une incubation de 30min.

Lors du passage des échantillons au cytomètre, le canal de sortie est réglé de façon à ce que les individus diploïdes présentent un pic à 100 (unités arbitraires), le pic des individus triploïdes se situant alors à 150.

#### III.3.4. Génotypage

Les huîtres sont issues de 16 familles différentes. La totalité des individus ont la même mère, mais ont des pères différents. Le but de ce travail est de voir s'il existe un déterminisme génétique à la sensibilité ou la résistance à une infection par des *Vibrio*. Pour ce faire, les animaux diploïdes (68 mortes + 79 survivantes) et triploïdes chimiques (57 mortes + 82 survivantes), qui ont subi la co-infection n<sup>o</sup>3, v ont faire l'objet d'une assignation de parenté.

##### III.3.4.1. L'extraction d'ADN

L'ADN de ces huîtres (mortes et survivantes, 2N et 3Nc) est extrait à partir d'un fragment de branchies (4 à 5 mm<sup>2</sup>), prélevé après l'ouverture et déposé dans des tubes eppendorfs référencés individuellement (conservation dans de l'éthanol 70 à -20°C). Pour cela un kit commercial de Promega (Wizard DNA Clean Up) est utilisé. L'extraction débute par une lyse des cellules de l'échantillon afin de libérer l'ADN contenu dans les noyaux. Pour cela, on utilise la Protéinase K (10mg/ml) et du tampon d'extraction CTAB (20ml de TrisHCl à 1M pH8 ; 16.36g de NaCl ; 8ml d'EDTA 0.5M ; 4g de CTAB ; qsp 200ml d'eau bidistillée). La Protéinase K va digérer les tissus (hydrolyse des liaisons peptidiques) pendant 3h à 65°C. Deux lavages au chloroforme isoamylalcohol sont ensuite effectués pour séparer les protéines de l'ADN. Il se forme alors une couche de protéines à l'interface chloroforme/phase aqueuse, après centrifugation de 5min à 25000g. La dernière étape consiste à purifier l'ADN contenu dans le surnageant (phase aqueuse) en utilisant une micro-colonne dans laquelle est injecté le mélange surnageant-résine (solution de lavage). Ainsi l'ADN est retenu sur la colonne et est donc séparé des protéines. La colonne est enfin rincée avec de l'isopropanol à 80% et l'ADN purifié est élué avec 50µl de Tris-EDTA.

##### III.3.4.2. Le dosage spectrophotométrique de l'ADN extrait

Le dosage spectrophotométrique permet d'ajuster la concentration des ADN (variable entre les individus du fait de la taille variable du fragment de branchies) aux conditions de la PCR. Pour cela, les ADN préalablement extraits sont dilués au 50<sup>ème</sup> dans du TE (Tris-EDTA) dans un volume final de 100µl. Le dosage est réalisé à l'aide du spectrophotomètre BioPhotometer d'Eppendorf. Les ADN sont ensuite dilués dans de l'eau bi-distillée (H<sub>2</sub>O Sigma) de sorte que leur concentration soit comprise entre 5µg/ml et 10µg/ml.

##### III.3.4.3. La PCR en multiplex

Afin de procéder à l'assignation de parenté, trois marqueurs moléculaires microsatellites, sont utilisés. Il s'agit de trois loci connus pour leur degré de polymorphisme et leur facilité de génotypage, CG49 (CA<sub>35</sub>)\*, CG108 (CA<sub>18</sub>) et L10 (AG<sub>26</sub>). Pour un gain de temps et une réduction de coût importante, l'amplification de ces trois microsatellites est effectuée en multiplexage. Les amorces utilisées, spécifiques de ces loci, sont décrites dans le tableau 7.

**Tableau 7 : Description des amorces pour la PCR en multiplex des trois loci étudiés (CG49, CG108 et L10)**

Locus	Fluoro-chrome	Couleur du signal	Séquence répétée	Sens	Amorces utilisées	Température d'appariement (°C)	Taille moyenne du produit de PCR (pb)
CG49	NED	noir	(CA) <sub>35</sub>	F R	CATCAGGGGTAAATTAAGTAAG CCACAGACGATTTTCATATATCCTG	53	162
CG108	FAM	bleu	(CA) <sub>18</sub>	F R	ATATGTAATGATTACGAAACT GTATGAGATTTGGTTCCACC	55	147
L10	HEX	vert	(AG) <sub>26</sub>	F R	GGTCAATTCAAAGTCAATTTCCC CATGTTTTCCCTTGACTGATCC	55	136

La PCR en multiplex est réalisée avec le thermocycleur à plaque de 96 puits « Gene amp® - PCR system 2700 » d'Applied Biosystems en utilisant le kit de réactifs pour PCR Multiplex de Qiagen. A 1µl d'ADN extrait sont ajoutés : 5µl de Master Mix (Quiagen), 1µl de solution Q (Quiagen), 2µl d'H<sub>2</sub>O bi-distillée (Sigma) et 1µl de mélange d'amorces (12.5µM) (Eurogentec).

La réaction d'amplification se déroule suivant ce programme : dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 15min, suivie par 30 cycles de 30sec à 94°C (dénaturation), de 1min30sec à 55°C (hybridation des amorces) et de 1min30sec à 72°C (élongation) et enfin une étape finale de 30min à 60°C.

\*(CA<sub>35</sub>) : 35 répétitions de la séquence CA

#### III.3.4.4. Le génotypage

Après amplification des ADN, le génotypage des huîtres aux trois loci considérés peut être réalisé. Pour cela, à 1µl de produit PCR, 9µl de formamide et 0.25µl de marqueur de taille Genescan™ ROX™ (Applied Biosystems) sont ajoutés. Une dénaturation pendant 5min à 95°C est effectuée. Les analyses sont réalisées sur un séquenceur à capillaire de type ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) utilisant du polymère POP4 et un jeu de 16 capillaires de 36 cm. Les données brutes sont collectées via le logiciel « Foundation Data Collection 3.0 » (Applied Biosystems) et les électrophorégrammes montrant les différents pics correspondant aux allèles amplifiés sont récupérés via le logiciel « GeneMapper v4.0 » (Applied Biosystems). Le génotype de chaque individu sont relevés et comparés aux génotypes parentaux à l'aide du logiciel « PAPA » (Package for the Analysis of Parental Allocation, Duchesne *et al.*, 2002). Le père le plus probable est alors associé aux individus correspondant à sa descendance.

#### III.4. Analyses statistiques

Les différences d'effectifs de survivants aux infections expérimentales ont été analysées par un test du Khi<sup>2</sup> à un seuil de significativité de 5% sous le logiciel StatView 5.0.

Concernant les données sur les pesées et les mesures d'occupation gonadique, une analyse de variance par la procédure GLM a été réalisée afin de tester l'effet du statut et de la ploïdie (variables explicatives) à l'aide du logiciel SAS V.8 (SAS Institute).

Concernant les données relatives à l'assignation de parenté, les effets du statut et de la ploïdie (variables explicatives) sur la probabilité de survie des 16 familles de demi-frères ont été analysés en utilisant une régression logistique par la procédure GENMOD à l'aide du logiciel SAS V.8 (SAS Institute).

## IV- RESULTATS

### IV.1. Comparaison des survies aux infections expérimentales

Au préalable, il est important de noter quelques points relatifs aux infections expérimentales :

- les quatre infections ont été réalisées dans des conditions strictement identiques.
- sur l'ensemble des expériences d'infection les taux de survie des bacs témoins sont de 100% démontrant que les mortalités observées sont bien le résultat de l'infection.
- la sensibilité des huîtres apparaît comme étant fortement dose-dépendante.

Enfin, on a fait le choix par souci de clarté de ne présenter que les survies obtenues toute dose confondue et à 120h post-infection, période classique d'observation de mortalités attribuables à l'infection expérimentale.

#### IV.1.1. Comparaison des survies des huîtres diploïdes aux quatre périodes de gamétogénèse

Les survies obtenues aux quatre infections réalisées durant des périodes de reproduction distinctes sont représentées dans le tableau 8A. L'analyse globale de ces taux de survie révèle des réponses similaires des huîtres diploïdes en début de gamétogénèse, en stade mature ainsi qu'en repos hivernal, les survies atteignant environ un taux de 40-45%. Par ailleurs, il est intéressant de noter que la survie obtenue durant la période qualifiée de post-ponte, à savoir 52,9%, est légèrement plus élevée. Les résultats des comparaisons statistiques des survies deux à deux sont représentés dans le tableau 8B, et montrent que la survie obtenue en période de post-ponte chez les huîtres diploïdes est significativement supérieure à celle obtenue en début de gamétogénèse, à un seuil de significativité de 5% ( $p(\text{Khi}^2)=0,0426$ ). De plus, il est intéressant de noter que la survie obtenue en période de post-ponte chez les diploïdes est également supérieure à celle obtenue en période de maturité gonadique, quoique non significatif ( $p(\text{Khi}^2)=0,0723$ ).

**Tableau 8 : Comparaison des survies à 120h post-infection aux différentes périodes de gonadogénèse pour les lots d'huîtres diploïdes et triploïdes.**

Début gamétogénèse : 06-05-07 ; mature : 05-07-07 ; post-ponte : 30-08-07 ; repos hivernal : 18-01-08. **A** : survies des huîtres diploïdes ; **B** : comparaison des survies des huîtres diploïdes aux différentes périodes ; **C** : comparaison des survies entre huîtres diploïdes et huîtres triploïdes aux différentes périodes. Cases jaunes : différences significatives à un seuil de 5%.

	Nbre d'individus injectés	Tx de survie (%)
	2n	2n
<b>début de gamétogénèse (1)</b>	125	40.0
<b>mature (2)</b>	96	40.6
<b>post-ponte (3)</b>	121	52.9
<b>repos hivernal (4)</b>	135	45.2

**A**

Comparaison	Khi <sup>2</sup>	p(Khi <sup>2</sup> )
1 vs 2	<b>0.009</b>	<b>0.9252</b>
1 vs 3	4.11	0.0426
1 vs 4	0.713	0.3984
2 vs 3	3.231	0.0723
2 vs 4	0.475	0.4906
3 vs 4	1.517	0.2181

**B**

	Nbre d'individus injectés		Tx de survie (%)		Khi <sup>2</sup>	p(Khi <sup>2</sup> )
	2n	3nc	2n	3nc		
<b>mature</b>	96	97	40.6	42.3	0.054	0.8168
<b>post-ponte</b>	121	115	52.9	67.0	4.849	0.0277
<b>repos hivernal</b>	135	91	45.2	36.3	1.781	0.182

**C**

#### IV.1.2. Comparaison des survies entre huîtres diploïdes et triploïdes

NB : les huîtres triploïdes chimiques n'ont pas été testées en période de début de gamétogénèse pour des raisons logistiques.

Les survies obtenues chez les diploïdes et les triploïdes aux trois infections réalisées durant des périodes de reproduction distinctes sont représentées dans le tableau 8C, tout comme les résultats de la comparaison statistique de ces survies.

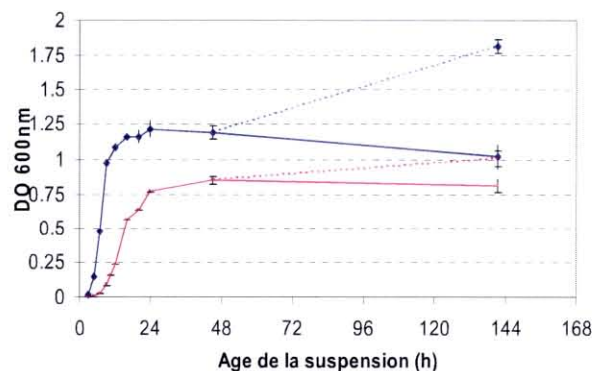
En période de maturité gonadique, la survie obtenue sur les lots triploïdes est identique à celle obtenue chez les diploïdes ( $p(Khi2)=0,8168$ ). Par contre, en période de post-ponte, la survie obtenue sur les lots triploïdes (67%) est significativement supérieure à celle obtenue chez les diploïdes (52,9%) ( $p(Khi2)=0,0277$ ). Enfin, en période de repos hivernal, la survie obtenue sur les lots triploïdes (36,3%) est inférieure à celle obtenue chez les diploïdes (45,2%). Ce résultats n'est cependant pas significatif statistiquement ( $p(Khi2)=0,182$ ).

## IV.2. Caractérisation des Vibrio

### IV.2.1. Courbes de croissance de *V. aestuarianus* et *V. splendidus*

#### IV.2.1.1. Dosages spectrophotométriques

L'évolution de la densité optique (DO) au cours du temps présente des profils différents en fonction de la bactérie, bien que les conditions de culture soient strictement identiques. En effet, l'augmentation de la DO est moins rapide chez *V. aestuarianus* que *V. splendidus*. A titre d'exemple, après 9h de croissance, *V. aestuarianus* présente une DO de seulement 0,08 alors que celle de *V. splendidus* est de 0,97. D'autre part, *V. aestuarianus* et *V. splendidus* présentent des valeurs de DO de 0,8 et 1,2 respectivement lors la phase de plateau (Figure 11). L'ouverture du tube à 45h et l'entrée d'air qui en découle entraînent une augmentation de la DO, qui est de 1 et 1,8 pour 02/041 et TR32 respectivement, lors de la phase de plateau.



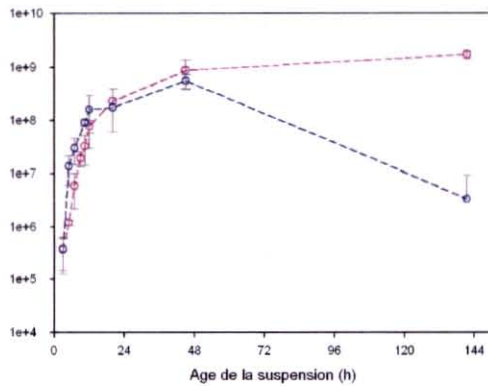
**Figure 11** : Cinétique de croissance de *V. splendidus* (TR32) et *V. aestuarianus* (02/041), à partir de dosages spectrophotométriques réalisés aux différents temps d'incubation.

02/041 sans aération : courbe rose continue ;  
 TR32 sans aération : courbe bleu continu ;  
 02/041 avec aération : courbe rose en pointillé ;  
 TR32 avec aération : courbe bleu en pointillé.

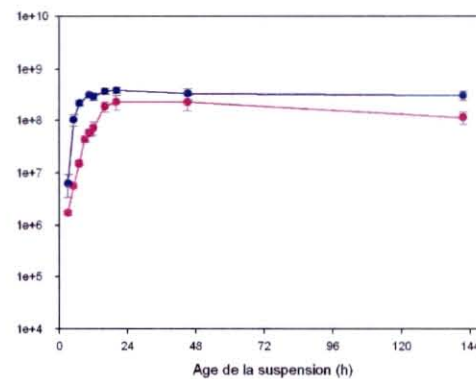
#### IV.2.1.2. Quantification des souches bactériennes par comptages sur boîte et par PCR quantitative

L'évolution des concentrations obtenues par la technique des comptages sur boîte montre des résultats similaires entre les deux espèces, jusqu'à la phase de plateau (45h). Par contre, à la fin du suivi de croissance (à 141h de culture), on observe des concentrations très différentes entre les deux souches, 02/041 à  $1,6 \cdot 10^9$  UFC/ml et TR32 à  $10^7$  UFC/ml. La linéarité quasi-parfaite de la cinétique de croissance des bactéries durant la phase exponentielle nous a permis de calculer le temps de génération des deux souches, correspondant au temps de division des cellules bactériennes. Ainsi les temps de génération de *V. aestuarianus* et *V. splendidus* sont respectivement de 60min et 41min. (Figure 12)

Les deux courbes obtenues par PCR quantitative (Figure 13) sont très semblables à celles obtenues par la méthode classique utilisée précédemment, si ce n'est la concentration bactérienne en *V. splendidus* obtenues à 141h qui reste stable par rapport à la concentration obtenue à 45h.



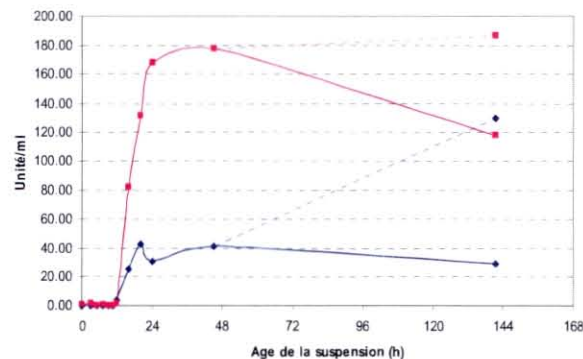
**Figure 12** : Cinétique de croissance de *V. splendidus* (TR32) et *V. aestuarianus* (02/041), à partir de concentrations bactériennes (calculées grâce aux dénombrements des colonies sur boîte de pétri) aux différents temps d'incubation.  
02/041 : courbe rose ; TR32 : courbe bleue.



**Figure 13** : Cinétique de croissance de *V. splendidus* (TR32) et *V. aestuarianus* (02/041) à partir de concentration bactérienne (calculée par PCR quantitative) aux différents temps d'incubation.  
02/041 : courbe rose ; TR32 : courbe bleue.

#### IV.2.2. Mesure de l'activité métalloprotéase *in vitro*

La production de métalloprotéase n'est détectable qu'après 12h de culture (0 unité/ml) pour les deux bactéries et plus spécialement à 16h, où des productions de métalloprotéase de 82unités/ml et de 25unités/ml sont observables pour 02/041 et TR32 respectivement (Figure 14). Cependant, la production de métalloprotéase est différente en fonction de la souche. En effet, à la phase de plateau (à 45h), *V. aestuarianus* (177unités/ml) produit environ quatre fois plus de métalloprotéase que *V. splendidus* (41unités/ml). Après 24h de culture, la production de métalloprotéase de TR32 est quasi stable, alors que celle de 02/041 diminue fortement. Il est notable que cette production est dépendante des conditions de culture. En effet, suite au changement d'air effectué à 45h dans le tube de culture (ouverture du tube), une augmentation notable de la production de métalloprotéase est observée concernant TR32 et une stabilité de production en ce qui concerne 02/041.



**Figure 14** : Evolution de l'activité métalloprotéase produite par *V. splendidus* (TR32) et *V. aestuarianus* (02/041) aux différents temps d'incubation. 1 unité protéase = quantité d'enzyme provoquant une augmentation de l'absorbance de 0,01.  
02/041 sans aération : courbe rose continue ;  
TR32 sans aération : courbe bleu continu ;  
02/041 avec aération : courbe rose en pointillé ;  
TR32 avec aération : courbe bleu en pointillé

Les effets de milieux de culture différents sur l'initiation de la production de métalloprotéase de la souche TR32 ont été étudiés, en utilisant soit du milieu Zobell soit un surnageant de culture de 24h issu de la souche déficiente en métalloprotéase (Double Delta VSM 509+2989, cf. Tableau 2). L'absence de production



de métalloprotéase par cette dernière souche mutée a été vérifiée. Seule la souche TR32 cultivée en milieu conditionné présente une activité métalloprotéase qui est détectée dès 3h d'incubation (Tableau 9).

**Tableau 9 : Résultats de l'induction de métalloprotéase par ajout de surnageant de la souche mutante Double Delta VSM 509+2989**

**TR32 Zobell** : culot bactérien de la souche TR32 au plateau repris dans du milieu liquide Zobell ;  
**TR32 surnageant** : culot bactérien de la souche TR32 au plateau repris dans du surnageant de la souche mutante Double Delta VSM ;  
**DOUBLE Δ Zobell** : culot bactérien de la souche mutante Double Delta VSM 509+2989 au plateau repris dans du milieu liquide Zobell

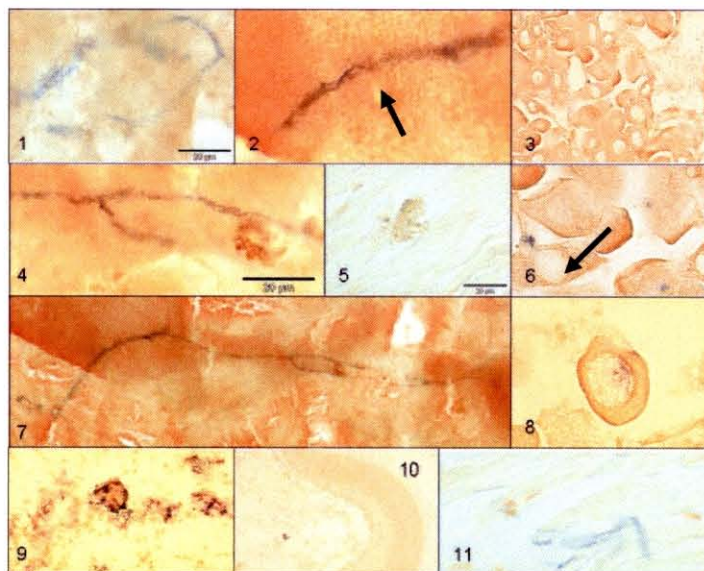
- : pas d'activité métalloprotéase ; X : détection d'activité métalloprotéase

AGE DE LA SUSPENSION (h)	TR32 Zobell	TR32 surnageant	DOUBLE Δ Zobell
0	-	-	-
0,5	-	-	-
1	-	-	-
1,5	-	-	-
2	-	-	-
3	-	X	-
5	-	X	-

#### IV.2.3. Localisation du pathogène TR32 chez l'hôte par immuno-histologie

Des animaux matures infectés par balnéation ont été analysés par immuno-histologie. Des foyers bactériens correspondant à la souche TR32 sont observés chez les animaux infectés seulement. La spécificité de ce test de détection a été établie en utilisant deux types de témoins : un animal non infecté et une lame de tissu d'animal infecté ayant été immuno-révélee en l'absence d'anticorps primaire. En effet, aucun signal correspondant à la souche TR32 n'a été observé sur ces lames témoins.

L'observation des lames au microscope à lumière blanche révèle la présence de nombreuses bactéries TR32 localisés dans différents tissus de l'huître (Figure 15). En effet, les photographies 1, 2, 3, 4, 6, 7 et 8 correspondent à des foyers bactériens présents dans la masse gonadique. Les photographies 1, 2, 4 et 7 illustrent la détection de souche TR32, probablement dans un vaisseau hémolympatique présent dans la gonade. Les photographies 5 et 11 correspondent à une partie du muscle adducteur dans lequel on détecte également des foyers de la souche TR32. Enfin, la souche TR32 est également détectée dans du tissu conjonctif (photographies 9 et 10). La photographie 9 présente un ovocyte dégénéré associé à de nombreuses bactéries TR32. Un foyer bactérien est détecté dans du tissu conjonctif à proximité de l'épithélium digestif.



**Figure 15 : Photographies de tissus d'huîtres contenant des foyers bactériens de la souche *Vibrio splendidus* TR32, apparaissant en bleu-noir en microscopie à lumière blanche. 1, 2, 3, 4, 6, 7 et 8 : masse gonadique ; 5 et 11 : muscle adducteur ; 9 et 10 : tissu conjonctif.**

### V.3. Description de l'huître *Crassostrea gigas*

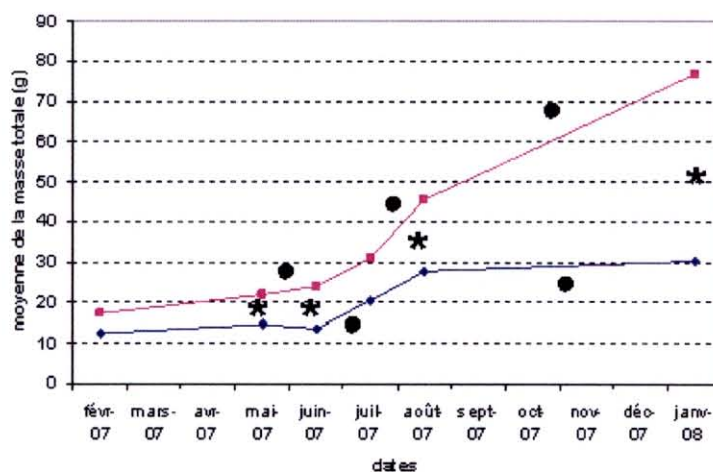
#### IV.3.1. Description de la croissance

Avant de calculer les indices de condition (IC) des huîtres diploïdes (2N) et triploïdes chimiques (3Nc), des pesées de masse totale et de masse de chair sèche ont été réalisées sur les animaux analysés (cf. Tableau 1).

##### IV.3.1.1. Masse totale

La masse totale fermée des triploïdes est supérieure à celle des diploïdes, toutes dates confondues. Les 3Nc évoluent d'une masse de 17g environ en Février 2007 à 77g en Janvier 2008, alors que les 2N passent de 12,5g à 30g à la même période (Figure 16). L'analyse des différences de masse entre lot et par date montre des mesures significativement supérieures chez les triploïdes le 6 Mai (p-value < 0.05), le 5 Juin (p-value < 0,0001), le 30 Août (p-value < 0,0001) et le 18 Janvier (p-value < 0,0001) (astérisques).

La masse totale fermée varie au cours du temps pour un même lot (ronds). Des augmentations significatives de la masse totale des huîtres 3Nc sont observées entre Mai à Juin (p-value < 0.05), Juillet et Août (p-value < 0,0001) et entre Août et Janvier 2008 (p-value < 0.05). Des augmentations significatives sont également observées pour les huîtres diploïdes de Juin à Juillet (p-value = 0,01) ainsi que de Août à Janvier (p-value < 0.05).



**Figure 16 : Evolution de la masse totale des huîtres diploïdes et triploïdes chimiques au cours de l'année.**

Diploïdes : courbe bleue ; Triploïdes chimiques : courbe rose.

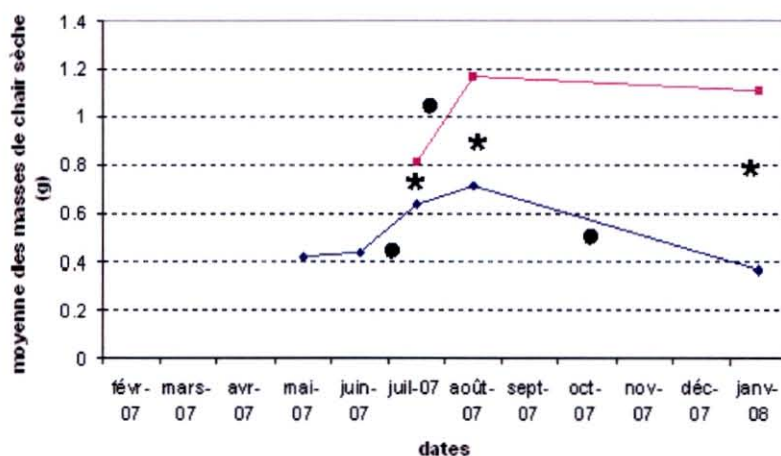
\* différence significative entre lot de pléidie ; • différence significative entre deux dates.

##### IV.3.1.2. Masse de chair sèche

La masse de chair sèche des triploïdes est supérieure à celle des diploïdes, toutes dates confondues. Les 2N évoluent de 0,64g en Juillet 2007 à 0,37g en Janvier 2008 alors que les 3Nc passent, aux mêmes dates, de 0,82g à 1,11g (Figure 17). L'analyse des différences de masse, entre lot et par date, montre des mesures significativement supérieures chez les triploïdes le 5 Juillet (p-value < 0.05), le 30 Août (p-value < 0,0001) et le 18 Janvier (p-value < 0,0001) (astérisques).

La masse de chair sèche varie au cours du temps pour un même lot (ronds). Pour les huîtres 2N, une augmentation significative de la masse de chair sèche est observée entre le 5 Juin et les 5 Juillet (p-value < 0.05) et une diminution entre le 30 Août et le 18 Janvier (p-value < 0.05). Pour les huîtres 3Nc, une

augmentation significative de la masse de chair sèche est observée entre le 5 Juillet et le 30 Août (p-value < 0.05).



**Figure 17 : Evolution de la masse de chair sèche des huîtres diploïdes et triploïdes chimiques au cours de l'année.**

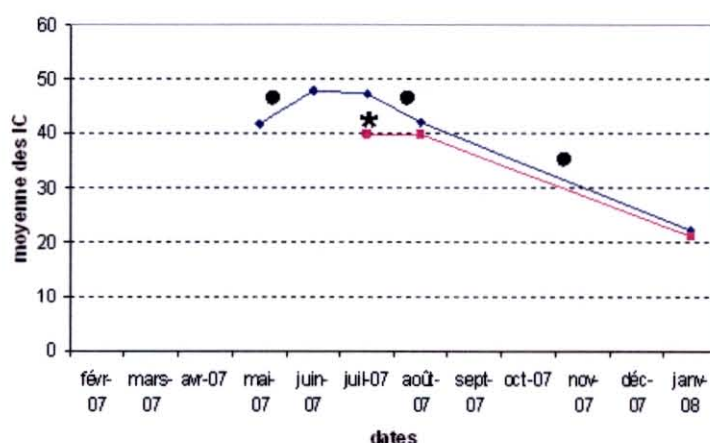
Diploïdes : courbe bleue ; Triploïdes chimiques : courbe rose.

\* différence significative entre lot de ploïdie ; • différence significative entre deux dates.

#### IV.3.1.3. Calcul des IC

L'indice de condition (IC) des diploïdes est légèrement supérieur à celui des triploïdes, toutes dates confondues. L'IC des huîtres 2N augmente de 41,9 à 47,7 de Mai à Juin, et chute de 47,4 à 22,1 de Juillet à Janvier, alors que, chez les 3Nc, il passe de 39,9 à 21 de Juillet à Janvier. (Figure 18). L'analyse des différences d'IC, entre lot et par date, montre des mesures significativement supérieures chez les diploïdes le 5 Juillet (p-value < 0.05) (astérisques).

L'IC varie au cours du temps pour un même lot (ronds). Pour les huîtres 2N, une augmentation significative de l'IC est observée d'une part entre le 6 Mai et le 5 Juin (p-value < 0.05) et d'autre part une diminution de l'IC est observée entre le 5 Juillet et les 30 Août (p-value < 0.05) et entre le 30 Août et le 18 Janvier (p-value < 0,0001). Pour les huîtres 3Nc, aucune variation significative de l'IC n'est observée.



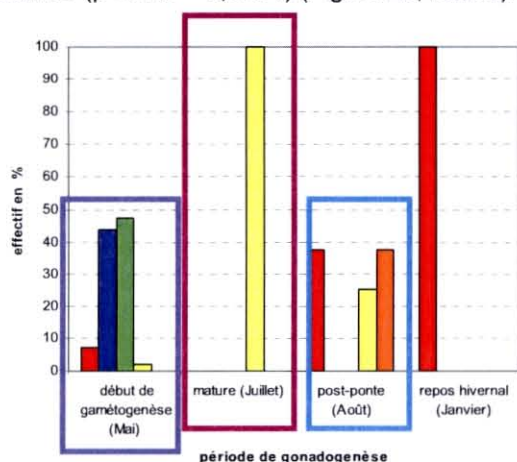
**Figure 18 : Evolution des Indices de conditions (IC) des huîtres diploïdes et triploïdes chimiques au cours de l'année.**

Diploïdes : courbe bleue ; Triploïdes chimiques : courbe rose.

\* différence significatif entre lot de ploïdie ; • différence significative entre deux dates.

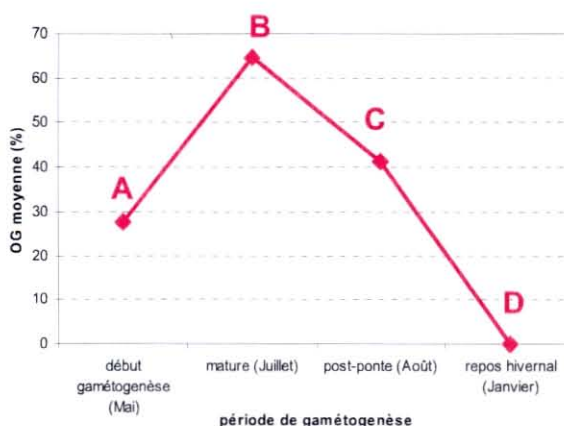
### IV.3.2. Description de la gonadogénèse

Les stades de maturité sexuelle varient au cours du temps, selon un mode classiquement observé. Les huîtres témoins sont en majorité immatures en Mai (47,3% de stade 2), sont matures en Juillet (100% de stade 3), régressent en Août (37,5% de stade 0 et 4) et enfin sont en repos en Janvier (100% de stade 0) (Figure 19). De plus, l'occupation gonadique varie également au cours du temps, selon un cycle de reproduction également classique. En effet, elle augmente significativement de 27,6% à 64,5%, de Mai à Juillet ( $p$ -value < 0,0001) et chute significativement de 41,4% en Août ( $p$ -value < 0,05), jusqu'à être nulle en Janvier ( $p$ -value < 0,0001) (Figure 20, lettres).



**Figure 19 :** Distribution des différents stades de maturité sexuelle chez les huîtres diploïdes aux cours de l'année.

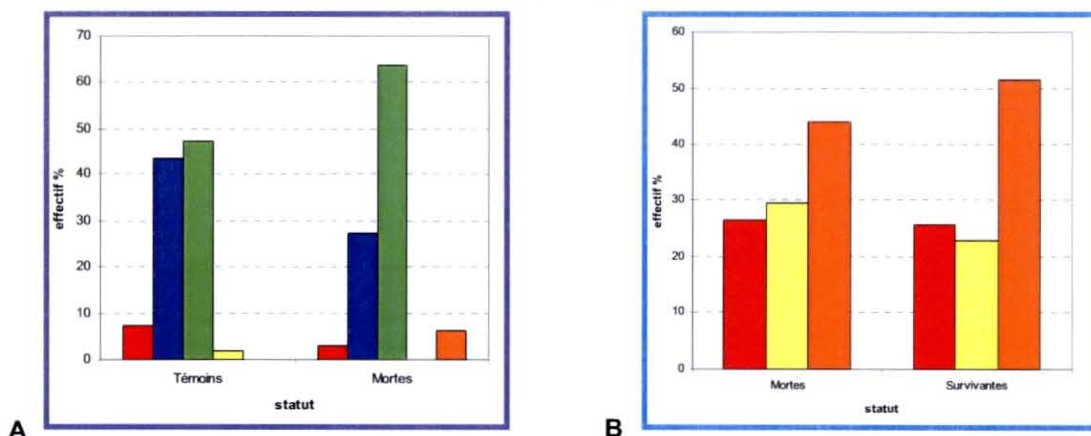
stade 0 : rouge, stade 1 : bleu, stade 2 : vert, stade 3 : jaune et stade 4 : orange.



**Figure 20 :** Mesure de l'occupation gonadique (OG) sur des huîtres témoins diploïdes aux quatre dates d'infection expérimentale.

Les lettres montrent les différences significatives entre périodes.

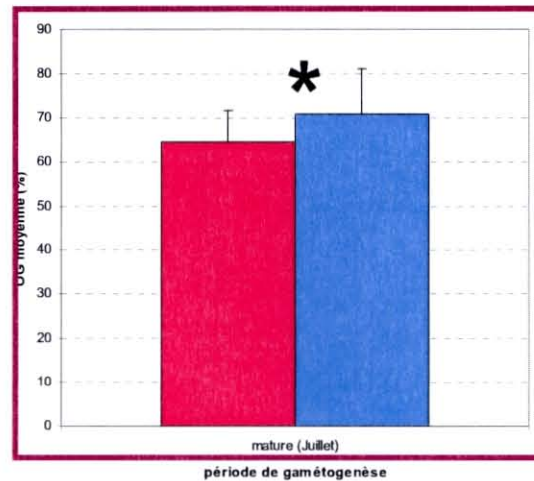
La comparaison de la distribution des stades de gamétogénèse selon la classification de Mann a été réalisée sur les animaux témoins, morts ou survivants issus des deux infections effectuées en début de gamétogénèse et en période de post-ponte. En effet, on observe une variabilité des stades de maturité sexuelle pour ces deux périodes. En effet, nous pouvons observer qu'en Mai, le stade 2 de maturité sexuelle semble être sur-représenté chez les huîtres mortes (63,6%) comparé aux témoins (47,3%). A contrario, le stade 1 semble être sous-représenté chez les huîtres mortes comparé aux huîtres témoins. Ces deux tendances ne sont cependant pas analysables statistiquement compte tenu de l'effectif réduit des animaux analysés (Figure 21-A). En Août, aucune différence de distribution des stades n'est observée entre les huîtres mortes et survivantes (Figure 21-B). Aucune analyse statistique n'a été effectuée pour la même raison.



**Figure 21 :** Répartition des huîtres témoins, mortes et survivantes diploïdes en fonction des différents stades de maturité sexuelle.

A- période de début de gamétogénèse (06-05-07) ; B- période post-ponte (30-08-07) ; stade 0 : rouge, stade 1 : bleu, stade 2 : vert, stade 3 : jaune et stade 4 : orange.

En période de maturité sexuelle (Juillet), toutes les huîtres présentent le même stade de maturité (stade 3). Dans ces conditions, une analyse d'occupation gonadique s'est avérée pertinente. Les huîtres mortes présentent des occupations gonadiques significativement ( $p$ -value  $< 0.05$ ) plus importantes que celles mesurées chez les huîtres témoins (Figure 22, astérisque).



**Figure 22 : Mesure de l'occupation gonadique (OG) sur des huîtres diploïdes témoins et mortes, en période de maturité gonadique.**

Huîtres témoins : rose, Huîtres mortes : bleu.

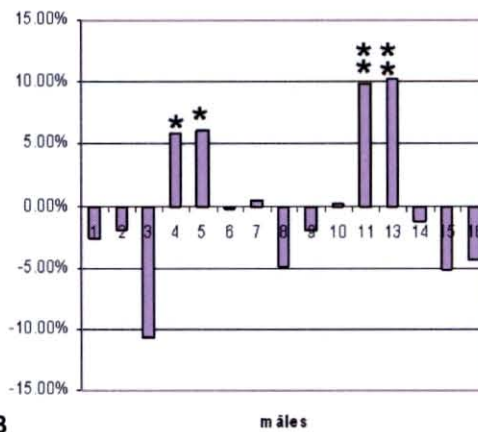
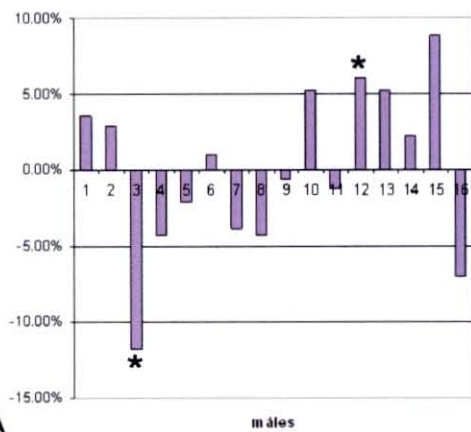
L'astérisque montre que la différence entre mortes et survivantes est significative.

#### IV.3.3. Analyse de parenté par génotypage

Dans l'hypothèse où il existe une composante génétique pour la résistance ou la sensibilité des huîtres à une vibriose expérimentale, il semblait intéressant de mettre en évidence la transmission de ce caractère phénotypique à la descendance par une comparaison des contributions de différents mâles dans des populations caractérisées pour leur réponse à une infection expérimentale et issues d'un croisement contrôlé (diploïdes et triploïdes). Les populations étudiées sont issues d'un croisement entre une seule femelle et seize mâles.

Tout d'abord, il est intéressant de noter qu'un an après la constitution des populations tous les pères sont encore représentés dans chacune des deux populations (diploïdes et triploïdes), à l'exception du géniteur 12 qui n'est pas représenté chez les huîtres triploïdes.

Par ailleurs, la contribution des pères semble contrastée en fonction du statut (mortes et survivantes) (Figure 23). Concernant les huîtres 2N, les mâles 3 et 12 tendent à avoir le plus d'impact sur le caractère mesuré, avec des  $p$ -values respectivement de 0,092 et de 0,081. La descendance du mâle 3 serait plus résistante à l'infection expérimentale. A contrario celle du mâle 12 présenterait une plus grande sensibilité (Figure 23-A). Concernant les huîtres 3Nc, la descendance des mâles 11 et 13 ( $p$ -values  $< 0.05$ ) est significativement plus sensible à une infection expérimentale, on observe la même tendance pour les descendance des mâles 4 et 5 malgré des  $p$ -values plus faibles ( $p$ -values respectivement égales à 0,056 et 0,064). Enfin aucun mâle ne semble transmettre une meilleure capacité de résistance à la descendance (Figure 23-B).



**A**

**B**

**Figure 23 : Contribution des 16 pères en pourcentage représentée en différence entre les statuts (Mortes-Survivantes)**

**A** : Huîtres diploïdes ; **B** : Huîtres triploïdes.

\* Significatif (p-value < 10%) ; \*\* très significatif (p-value < 5%).

## V- DISCUSSION

---

### **V.1. *Vibrio splendidus* et *Vibrio aestuarianus* : deux pathogènes à physiologie différente ?**

#### V.1.1. Deux *Vibrio* à la croissance différente.

Les dosages spectrophotométriques, les comptages sur boîte ainsi que la quantification par PCR quantitative nous ont permis de construire trois courbes de croissance pour les deux souches de *Vibrio* étudiées. Ces courbes suggèrent toutes que TR32 et 02/041 présentent une croissance légèrement différentes *in vitro* en fonction du temps.

En effet, jusqu'à 12h de culture, TR32 présente une croissance plus rapide que 02/041. Les temps de division des cellules bactériennes calculés en phase exponentielle illustrent ce résultat : le temps de division de la souche *V. splendidus* est de 41min alors que celui de la souche *V. aestuarianus* est de 60min.

Cependant à 24h de culture, les deux souches atteignent un plateau à des concentrations similaires (entre  $10^8$  et  $10^9$  UFC/ml). Parmi les facteurs d'inhibition de la croissance, encombrement stérique des souches et appauvrissement du milieu notamment, l'absence d'oxygène semble être le facteur le plus limitant (cf infra).

Par ailleurs, les différences de concentration des deux souches en phase de plateau observées selon la méthode de quantification utilisée (densité optique ou étalement sur boîte) peuvent s'expliquer par le fait que ces deux souches présentent une morphologie différente, comme révélée par des études de cytométrie de flux. En effet par spectrométrie TR32 en phase de plateau semble plus concentrée que 02/041 (DO de 1,2 et 0,8 respectivement) alors que les comptages sur boîte fournissent un résultat opposé. Il est probable que les différences morphologiques entre les deux souches aient un impact sur les mesures spectrophotométriques.

De plus, les résultats obtenus à partir de la quantification en PCR quantitative sont à comparer avec ceux obtenus par la méthode classique de comptage sur boîte. Jusqu'à 45h, les deux méthodes aboutissent à des concentrations similaires quelque soit la souche considérée. Cependant il est intéressant de noter la plus grande précision obtenue en PCR quantitative, les écart-types entre triplicats biologiques étant très faibles comparés à ceux obtenus par la méthode classique de comptage sur boîte. En effet, cette méthode classique de comptage par étalement implique de nombreuses manipulations de laboratoire (gammes de dilution, nombreux pipetages, ...) qui induisent une accumulation de biais techniques à l'origine de cette variabilité. Par ailleurs, à 141h une diminution nette de la concentration de TR32 par la technique de comptage sur boîte. Ce phénomène n'est pas observé par la technique de PCR quantitative. Ceci peut s'expliquer par le fait que la PCR quantitative permet de détecter non seulement les bactéries viables mais également celles mortes présentant un matériel génomique encore intègre et donc amplifiable par PCR.

#### V.1.2. Croissance et activité métalloprotéase modulées par les conditions de culture.

A 45h d'incubation, une série de tube a été ouverte puis refermée, afin de renouveler l'air des tubes, puis à nouveau incubée à 20°C sous agitation. Cette aération a induit une importante augmentation de DO pour les deux souches traduisant une stimulation de la croissance bactérienne. En effet, la plupart des *Vibrio* étant des bactéries aéro-anaérobie facultatives, un apport d'oxygène stimule de ce fait leur métabolisme et peut provoquer alors une augmentation de la croissance. Ces résultats suggèrent que la croissance bactérienne est fortement dépendante des conditions de culture et *a fortiori* des paramètres environnementaux. Ces courbes de croissance sont donc spécifiques des conditions de culture utilisées. Une variation dans ces conditions entraînera obligatoirement une modification dans ces cinétiques.

De même, la production de métalloprotéase est fortement influencée par ce renouvellement d'air dans les tubes de culture. En effet, l'activité métalloprotéase produite par TR32 augmente de 30unités/ml (activité observée dans les conditions normales de culture) à 130unités/ml. L'activité métalloprotéase produite par 02/041 en condition normale de culture est d'environ 120unités/ml, alors que celle observée suite à l'aération est d'environ 185unités/ml. Ceci suggère l'importance des facteurs environnementaux dans la modulation de la production de ce facteur de virulence. De plus, il est important de noter qu'en condition normale de culture, la production de métalloprotéase de 02/041 est plus de quatre fois supérieure à celle de TR32 à 45h, avec respectivement des activités de 180unités/ml et 40unités/ml.

Ce résultat ouvre des perspectives intéressantes. En effet, une expérience, *in vitro*, de mesure d'activité métalloprotéase peut être réalisée pour mettre en évidence l'effet de facteurs « environnementaux » susceptibles de moduler la croissance et surtout l'activité métalloprotéase, comme par exemple l'O<sub>2</sub> dissous ou la température. Ceci est à relier au caractère multifactoriel des mortalités estivales de l'huître creuse. Ensuite, il peut être intéressant de caractériser l'effet de ces mêmes facteurs modulant la production de métalloprotéase sur la pathogénicité des souches en infection expérimentale.

Enfin, il pourrait être intéressant d'envisager des expériences similaires (croissance et production de métalloprotéase) dans des milieux non synthétiques comme le milieu Zobell se rapprochant le plus possible des conditions *in vivo*, comme par exemple des broyats d'huîtres ou de l'hémolymphe. Et, un dernier point peut être envisagé afin de mettre en évidence des facteurs internes propres à l'hôte susceptibles de moduler la production de métalloprotéase, comme par exemple la concentration en fer disponible, un élément essentiel à la croissance de nombreux vibrios.

#### V.1.3. Un mécanisme de virulence contrôlé par un phénomène de quorum-sensing ?

Il est particulièrement intéressant de noter qu'une activité métalloprotéase n'est détectée dans nos conditions de culture qu'à partir de 16h d'incubation chez les deux souches étudiées. Ce résultat suggère que la production de ce facteur de virulence est densité-dépendante. C'est-à-dire qu'à une certaine concentration bactérienne, la production de métalloprotéase va être induite. Cela laisse présager de l'existence d'un phénomène de quorum-sensing.

Ce phénomène est un mécanisme dans lequel les bactéries coordonnent l'expression de certains gènes en réponse à leur densité de population en produisant, libérant de petites molécules « signal ». Les phénotypes contrôlés par un système de quorum-sensing comprennent la luminescence, la conjugaison, la nodulation, la sporulation, la biocorrosion, la production d'antibiotique, la formation de biofilm et l'expression de facteurs de virulence. Le lien entre le quorum-sensing et l'expression de facteur de virulence bactérien a notamment été très étudié. Le quorum-sensing d'organismes pathogènes augmenterait probablement leur chance d'infecter leur hôte en retardant la production de facteur de virulence jusqu'à ce que la densité de population soit assez importante pour résister efficacement aux mécanismes de défense de l'hôte (Defoirdt *et al.*, 2004). Les bactéries contrôlent leur densité cellulaire en sécrétant des molécules signal nommées « autoinducers ». Chez les organismes Gram-négatifs, les « autoinducers » comprennent des acyl-homoserine-lactones (AHL). En plus de ces AHL, certaines bactéries Gram-négatives et Gram-positives produisent une molécule signal non-AHL nommée « Autoinducer 2 » (AI-2) correspondant à une furanone borate diester (Denkin et Nelson, 2004).

Dans l'article de Denkin et Nelson (2004), le phénomène de quorum-sensing a été démontré en induisant la production de la métalloprotéase à partir d'une suspension bactérienne de *V. anguillarum* ne présentant normalement aucune activité du fait de sa faible concentration. Le surnageant d'une culture bactérienne de la souche mutée sur le gène codant la métalloprotéase contient les molécules « signal » utiles au quorum-sensing mais par contre ne contient pas de métalloprotéase (d'où l'absence d'activité

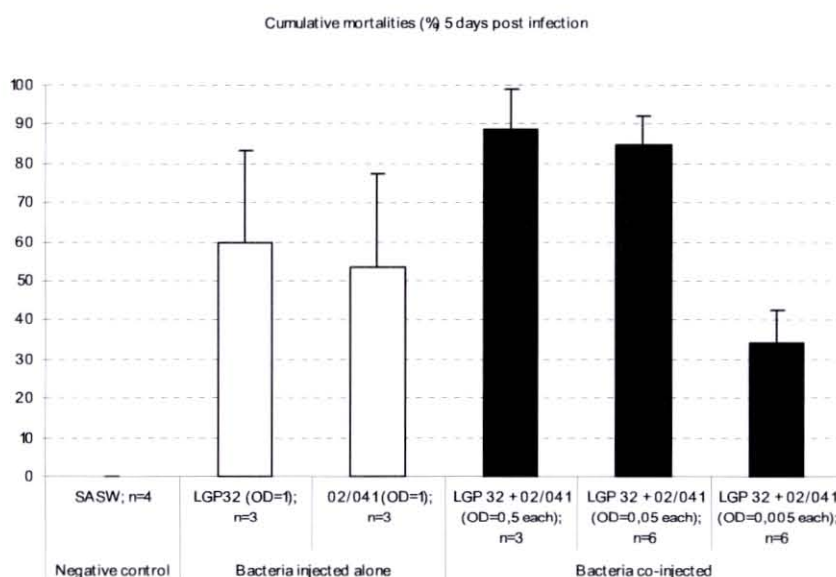


métalloprotéase dans les cultures témoins de la souche mutée). C'est pourquoi l'ajout de ce surnageant dans une suspension bactérienne de faible concentration (à partir de laquelle aucune métalloprotéase ne doit être produite si sa production est dépendante de la concentration bactérienne) a induit la production de ce facteur de virulence. L'utilisation du surnageant de la souche mutée permet de s'assurer que les métalloprotéases produites et détectées sont bien celles de la souche testée. C'est pourquoi dans notre étude, nous avons réalisé cette expérience de la même façon, en utilisant la souche mutée Double Delta VSM 509+2989 et la souche TR32. La production de métalloprotéase en milieu conditionné a été induite au bout de 3h alors qu'elle n'est pas détectée, dans un milieu classique de culture, même 5h post incubation. Ce résultat suggère l'existence de molécules « signal » dans les surnageants de la souche Double Delta. Ces résultats seront confirmés prochainement en augmentant les durées d'incubation des souches bactériennes dans le milieu conditionné ou non (Zobell).

En dehors de cette approche développée *in vitro*, le rôle des métalloprotéases dans le processus infectieux pourrait être précisé en quantifiant non seulement les concentrations en bactéries pathogènes dans les différents tissus mais également les niveaux de production en métalloprotéase.

#### V.1.4. Un phénomène de synergie à explorer

Lors d'infection expérimentale, les deux souches sont injectées en même temps et à la même dose. Il a été observé que cette co-injection entraîne des mortalités plus importantes des huîtres creuses que celles observées par injection des deux *Vibrio* seuls aux mêmes doses (Figure 24). Ces observations mettent en évidence une synergie entre les deux souches qui peut être à l'origine de ce différentiel de mortalité. Des expérimentations réalisées *in vitro*, par co-culture de *V. splendidus* et *V. aestuarianus* devraient permettre de comprendre les bases de la synergie observée *in vivo* : la co-culture favorise-t-elle leur capacité de croissance ou/et de production de métalloprotéase ?



**Figure 24 : Taux de mortalité cumulés (%) à 5 jours post-injection des souches LGP32 et O2/041.**

Les souches ont été injectées individuellement à partir d'une suspension bactérienne à la DO=1.

Les mêmes souches ont été injectées en mélange et aux mêmes doses.

De l'eau de mer artificielle stérile (SASW) est utilisée comme contrôle négatif.

Quinze à vingt huîtres injectées sont placées dans chaque aquarium.

Le symbole « n » indique le nombre d'aquarium ou réplicats et les barres représentent l'erreur standard.

(Saulnier et al., *in prep.*)

Enfin, un test liant les phénomènes de synergie et de quorum-sensing peut être envisagé. En effet, il serait intéressant de voir si le surnageant de l'une des deux souches étudiées induit la production de métalloprotéase chez l'autre. Dans cette étude, nous avons travaillé avec le surnageant de la souche mutée Double Delta VSM 509+2989 pour induire la production de métalloprotéase chez TR32. La même expérience peut être réalisée, mais en induisant la production de métalloprotéase chez *V. aestuarianus* 02/041.

#### V.1.5. *Vibrio splendidus* TR32 localisée dans de nombreux tissus de l'huître creuse

Les animaux analysés en immuno-histologie ont été infectés par des *Vibrio splendidus* TR32 par balnéation. Ce mode d'infection permet de se rapprocher le plus possible de celui qu'on observerait dans l'environnement naturel. Cela donne alors une information sur les processus d'infection au sens strict, à savoir sur les voies d'entrée, sur les tissus de prédilection de TR32 pour la colonisation et la totale infection de l'hôte. En effet, TR32 a été détectée de façon spécifique dans divers tissus tels que la masse gonadique, le muscle adducteur et le tissu conjonctif. Désormais, il serait très intéressant de réaliser d'une part la même expérience en infectant les huîtres avec la souche *Vibrio aestuarianus* 02/041, et de réaliser d'autre part une cinétique de détection au cours d'une infection afin de documenter la pathogénèse au niveau tissulaire.

#### **V.2. Recherche des facteurs influençant la capacité de résistance de l'huître à une vibriose.**

Les travaux réalisés au cours du programme Morest a largement illustré le caractère multifactoriel des phénomènes de mortalités estivales. La littérature consacrée aux mortalités d'huîtres a interprété le différentiel de mortalité saisonnier (réurrence des mortalités estivales) comme la résultante d'une variation de l'état de santé de l'hôte. En effet, la sensibilité de l'huître dépend notamment de l'énergie disponible pour résister à un stress. Cette quantité d'énergie est variable au cours de l'année (disponibilité en nourriture) et cette variation pourrait se traduire par une sensibilité différente en fonction des saisons.

De plus, cette énergie est mobilisée pour assurer la reproduction dont l'intensité varie fortement en fonction des saisons et qui est inversement corrélée à la résistance (Samain *et al.*, 2007). Par ailleurs, il a été montré chez plusieurs espèces d'intérêt aquacole une composante génétique à la résistance à des pathogènes. D'autre part, les huîtres triploïdes sont très différentes des diploïdes dans le fractionnement de leur allocation aux fonctions physiologiques. Elles présentent une croissance plus rapide, une meilleure survie ainsi qu'une réduction forte mais variable de l'effort de reproduction (Normand *et al.*, *in prep.*). Or, ces différences devraient également leur conférer une capacité de résistance différente de celle des huîtres diploïdes : l'économie d'énergie réalisée par la diminution de la reproduction pourrait permettre la ré-allocation de celle-ci vers la résistance à un pathogène.

L'ensemble de ces facteurs (reproduction, état de santé, composante génétique et triploïdie) identifiés donc comme influençant la sensibilité de l'huître dans les phénomènes de mortalités estivales mérite d'être étudié dans la cas précis d'une vibriose. C'est là tout l'objectif de l'analyse de la réponse des huîtres aux infections expérimentales.

##### V.2.1. Effet de la gonadogénèse

La comparaison des survies des huîtres diploïdes aux différentes périodes de reproduction ne met pas évidence des différences de sensibilité très contrastées même si des tendances intéressantes sont à noter. En effet, en début de gamétogénèse qu'en période mature et en repos hivernal, les survies obtenues sont environ de 40-45% alors qu'en période post-ponte (fin de gonadogénèse) la survie obtenue est de 52,9%. L'analyse du  $\chi^2$  de ce différentiel de survie montre qu'il est significatif. Cette meilleure survie peut donc être expliquée en partie par la gonadogénèse. L'analyse précise des stades en histologie confirme cette

tendance. En effet, au cours de l'infection 1 (début de gamétogenèse), le stade le plus avancé de gamétogenèse, à savoir le stade 2, est sur-représenté chez les individus morts (63,6%) comparé aux témoins (47,3%) (cf. Figure 21A). De la même façon, l'analyse de l'occupation gonadique au cours de l'infection 2 (période mature) révèle que les huîtres mortes présentent des occupations gonadiques significativement ( $p$ -value <0.05) plus importantes que celles mesurées chez les huîtres témoins (cf. Figure 22, astérisque). Enfin, l'analyse histologique réalisée au cours de l'infection 3 (période de post-ponte) ne révèle aucune différence significative de la répartition de stades observés chez les individus morts et survivants (cf. Figure 21B).

Pour conclure, il existe probablement un effet de la gonadogénèse sur la sensibilité des huîtres mais cet effet apparaît peu impactant dans notre étude, compte tenu des faibles corrélations observées entre le critère « survie » et les paramètres de reproduction étudiés (stades de maturité sexuelle et occupation gonadique). Ces résultats sont surprenants au regard des données de la littérature.

#### V.2.2. Effet de l'état de santé

Les survies obtenues à l'issue de l'infection réalisée en période de repos hivernal sont du même ordre que celles observées en début de gamétogenèse, en période mature, mais sont inférieures à celles obtenues à l'issue de l'infection réalisée en période de post-ponte. Cette chute de la survie (on aurait pu s'attendre à des survies meilleures hors période de reproduction, cf. paragraphe ci-dessus) peut être expliquée par les faibles IC observés en hiver (cf. Figure 18). On a choisi comme descripteur de l'état de santé des huîtres l'indice de condition (IC). En effet, cet indice rend compte de la croissance de l'animal à relier directement à son état de santé. La sensibilité de l'huître dépend notamment de l'énergie disponible pour résister à un stress et pourquoi pas à une vibriose. Cette quantité d'énergie est variable au cours de l'année (disponibilité en nourriture). Cette diminution de l'énergie disponible en hiver pourrait expliquer dans notre cas la plus grande sensibilité des huîtres à cette saison observée sur les survies obtenues en infection expérimentale.

Pour conclure, il existe probablement un effet de l'état de santé sur la sensibilité des huîtres même si cet effet ne permet pas à lui seul d'expliquer la variabilité de la sensibilité des huîtres à une vibriose.

#### V.2.3. Effet de la ploïdie

Les survies obtenues en période de post-ponte pour les huîtres triploïdes sont significativement plus importantes que celles obtenues pour les huîtres diploïdes (respectivement 67% et 52,9%). Les survies obtenues en période mature et de repos hivernal sont similaires à celles obtenues chez les huîtres diploïdes. D'après ces résultats, nous pouvons donc voir que malgré un effort reproducteur diminué chez les triploïdes et une croissance effectivement plus importante, ces dernières ne montrent pas une capacité de résistance considérablement plus grande que les diploïdes. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les huîtres triploïdes sont susceptibles de présenter des paramètres physiologiques différents des diploïdes. De plus, nous avons vu que les périodes gamétogenèse et de pleine maturité sont celles pendant lesquelles la survie des huîtres diploïdes est la plus faible. La variabilité physiologique annuelle de l'huître entraîne donc une variabilité de la capacité de résistance chez les diploïdes comme chez les triploïdes.

En Janvier lors la période de repos hivernal pendant laquelle les tissus gonadiques ne se développent plus, les huîtres triploïdes tout comme les diploïdes présentent des survies légèrement plus faibles par rapport à la période post-ponte (Août). Comme pour les huîtres diploïdes, ceci pourrait être expliqué par les faibles IC observés chez les triploïdes en hiver, résultat d'un manque de nutriments dans le milieu en cette période où les conditions environnementales sont peu propices à la croissance. De plus, les huîtres triploïdes présentent une très forte augmentation de 41% de la masse totale fermée ainsi qu'une légère diminution de la masse de chair sèche. Cette forte allocation de l'énergie à la croissance observée

chez les triploïdes en hiver (et non chez les diploïdes) peut sans doute expliquer le léger différentiel de survie obtenu entre diploïdes (45,2%) et triploïdes (36,3%) à cette saison.

Pour conclure, il n'apparaît pas clairement que les huîtres triploïdes présentent un meilleur potentiel de résistance que les huîtres diploïdes à une vibriose induite expérimentalement.

#### V.2.4. Effet d'une composante génétique

Comme nous l'avons détaillé dans l'étude bibliographique, la sélection de lignées d'huîtres résistantes aux pathogènes est une voie d'amélioration génétique prometteuse (Samain et McCombie, 2007b). Des programmes de sélection ont permis d'obtenir des lignées d'huîtres creuses diploïdes résistantes et d'autres sensibles aux phénomènes de mortalités estivales pouvant effectivement impliquer l'action d'un *Vibrio* pathogène. Mais le fait que cette sélection a réussi pour les huîtres diploïdes n'assure pas un tel succès pour les huîtres triploïdes. De plus, la production d'huîtres triploïdes chimiques passant par le croisement d'huîtres diploïdes, utiliser des individus triploïdes sélectionnés sur leurs caractères d'intérêt pour engendrer directement des lignées présentant ces caractères est inenvisageable. Il faut donc sélectionner des géniteurs diploïdes conférant la résistance à leur descendance et induire la triploïdie sur cette dernière. Mais, selon Blanc et al. (2001), des études portant sur d'autres modèles ont montré que l'induction de la triploïdie impactait fortement la transmission des caractères génétiques parentaux à la descendance. En effet, les valeurs des traits phénotypiques de la descendance ne sont pas strictement la résultante des valeurs génétiques des parents. Cela veut dire que la sélection de géniteurs diploïdes présentant des caractères d'intérêt ne permet donc pas de s'assurer de la transmission de ceux-ci à la descendance triploïde.

L'analyse des assignations de parenté montre qu'il existe une contribution différente des géniteurs mâles chez les individus morts comparé aux survivants. Cela suggère que la résistance des huîtres à une vibriose peut être dépendante du géniteur, et donc qu'une part de la variabilité de la résistance est d'origine génétique. Ceci est observé chez les huîtres diploïdes comme chez les huîtres triploïdes. Sélectionner des géniteurs capables de produire une descendance résistante à une infection par des *Vibrio* constitue donc une solution prometteuse aux problèmes des mortalités massives d'huîtres, tout au moins chez les diploïdes. Cependant chez les 3N, ou une interaction de la ploïdie avec la valeur génétique des parents était suspectée, il semble que les pères engendrant une descendance plus sensible sont différents de ceux représentés chez les diploïdes. Donc en fonction de la ploïdie, la contribution des géniteurs mâles est différente. Cette variabilité de la descendance en fonction de la ploïdie nous montre que les géniteurs sélectionnés en diploïde ne supportent pas forcément la triploïdie.

La triploïdie pose donc un sérieux problème pour la sélection de géniteurs capables de transmettre la résistance à leur descendance. D'autre part, dans cette étude, il a été question d'étudier la contribution du père dans la descendance diploïde comme triploïde. Or il serait également très intéressant d'étudier celle de la mère qui surtout chez les triploïdes est probablement importante. Chez les diploïdes, le génome de la descendance est issu de la fusion à part égale des génomes paternels et maternels, alors que chez les huîtres triploïdes issues d'induction chimique, les deux tiers du génome proviennent de la mère et seulement un tiers vient du père. Il serait donc logique que pour ces animaux là, les effets d'origine maternelle soient plus explicatifs que ceux d'origine paternelle comme cela a été montré chez la truite arc-en-ciel (Blanc *et al.*, 2001).

Il est donc évident que l'utilisation de la triploïdie en amélioration génétique des lignées d'huîtres creuses est complexe. Il faudra donc beaucoup de mises au point pour s'engager dans cette direction de sélection de lignées diploïdes afin d'obtenir une descendance triploïde résistante à une infection par des *Vibrio*.

## VI- CONCLUSION

---

Pour conclure cette étude quoique très ambitieuse montre qu'il n'existe probablement pas un seul facteur susceptible d'expliquer à lui seul la sensibilité de l'huître à une vibriose, même si chacun l'influence à des degrés divers. Reproduction, état de santé, ploïdie et composante génétique semblent agir en interaction, ce qui conforte l'idée d'un phénomène plurifactoriel.

Cependant, il est important de noter que même si l'outil d'infection expérimentale reste un modèle d'intérêt dans l'étude des vibrioses et présente de nombreux avantages (contrôle des agents pathogènes, des doses, des conditions d'infection,...), ce dernier manque peut-être de sensibilité devant la complexité des phénomènes de mortalités. Il est important de garder à l'esprit que l'ensemble des résultats de cette étude est lié à ce mode expérimental qui ne reproduit évidemment pas les infections naturelles. Il serait de ce fait très intéressant de mettre au point les infections expérimentales par balnéation, modalité probablement plus représentative des conditions d'infection dans le milieu naturel. De plus, le vivant par définition présente des caractéristiques physiologiques et génétiques variables et difficiles à caractériser. L'obtention de lignées d'animaux de « laboratoire » présentant chacune une homogénéité des caractéristiques physiologiques et génétiques entre individus, par des techniques de clonage par exemple, devraient à l'avenir faciliter ce type d'étude.

## VII- Références bibliographiques

---

- Allen S.H.Jr. et Downing S.L., 1986. *Performance of Triploid Pacific Oyster, Crassostrea gigas (Thunberg), I., Survival, growth, glycogen content and sexual maturation in yearlings*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., **102**, 197-208.
- Beaumont A.R., Fairbrother J. et Hoare K., 1991. *Ploidy manipulation in molluscan shellfish : a review*. Journal of Shellfish Research, **10**, 1-18.
- Bierne N., Beuzart I., Vonau V., Bonhomme F. et Bédier E., 2000. *Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp Penaeus stylirostris*. Aquaculture, **184**, 203-219.
- Blanc J.-M. et Vallée F., 1999. *Variabilité génétique des performances d'élevage chez quelques espèces et hybrides de Salmonidae soumis à la triploïdisation*. Cybium, **23**(1), 77-88.
- Blanc J.-M., Poisson H. et Vallée F., 2001. *Covariation between diploid and triploid progenies from common breeders in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum)*. Aquaculture Research, **32**, 507-516.
- Booth B.A., Boesman-Finkelstein M. et Finkelstein R.A., 1984. *Vibrio cholerae hemagglutinin/protease nicks cholera enterotoxin*. Infect. Immun., **45**, 558-560.
- Boudry P., 2003. *Diversité génétique chez les huîtres creuses du genre Crassostrea : quelles ressources pour quelle amélioration des productions de C. gigas*. HDR, Université de Lille 1, France.
- Boudry P., Dégremont L., Bédier E., Pouvreau S., Normand J. et Ernande B., 2006. *Genetic variation and trade-offs for reproduction and survival in the Pacific oyster Crassostrea gigas*. Workshop "Physiological aspects of Reproduction and Nutrition of Mollusks".
- Cheng T.C., 1981. *Bivalves*. Invertebrate Blood Cells, **1**, 231-300.
- CNC (comité national de la conchyliculture), 2006-2007.
- Crocos P., Davis G., Preston N. et Keys S., 2000. *Comparative growth, survival and reproductive performance of inbred and outbred lines of domesticated shrimp, Penaeus japonicus, in Australia*. In Book of abstracts, International Symposium for Genetic in Aquaculture, Townsville, Australia, 15-22/07/2000, p. 45.
- Defoirdt T., Boon N., Bossier P. et Verstraete W., 2004. *Disruption of bacterial quorum sensing : an unexplored strategy to fight infections in aquaculture*. Aquaculture, **240**, 69-88.
- Denkin S.M. et Nelson D.R., 2004. *Regulation of Vibrio anguillarum empA metalloprotease expression and its role in virulence*. Applied and environmental microbiology, **70**, 4193-4204.
- Deslou-Paoli et Héral, 1988. *Biochemical composition and energy value of Crassostrea gigas (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron*. Aquat. Living Resour., **1**, 239-249.
- Duchesne P., Godbout M.-H. et Bernatchez L., 2002. *PAPA (package for the analysis of parental allocation) : a computer program for simulated and real parental allocation*. Molecular Ecology Notes, **2**, 191-193.
- Ernande B., Boudry P., Clobert J. et Haure J., 2004. *Plasticity in resources allocation based life history traits in the Pacific oyster, Crassostrea gigas. Spatial variation in food abundance*. J. Evol. Biol., **17**, 342-356.
- FAO (Food and agriculture organization – organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture), 2006.
- Faury N., Saulnier D., Thompson F.L., Gay M., Swings J. et Le Roux F., 2004. *Vibrio crassostrea sp. nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters (Crassostrea gigas)*. Int J Syst Evol Microbiol, **54**, 2137-2140.

- Gagnaire B., 2005. *Etude des effets de polluants sur les paramètres hématocytaires de l'huître creuse, Crassostrea gigas – Interactions entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses*. Thèse, Université de La Rochelle, France. 377p.
- Garnier M., Labreuche Y., Garcia C., Robert M. et Nicolas J.L., 2007. *Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster Crassostrea gigas*. Microbiol. Ecology, **53**(2), 187-196.
- Gay M., 2004. *Infections expérimentales chez Crassostrea gigas : étude de deux souches pathogènes apparentées à Vibrio splendidus*. Thèse, Université de La Rochelle, France. 179p.
- Gay M., Berthe F.C. et Le Roux F., 2004a. *Screening of Vibrio isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster Crassostrea gigas*. Dis. Aquat Organ., **59**(1), 49-56.
- Gay M., Renault T., Pons A.M. et Le Roux F., 2004b. *Two vibrio splendidus related collaborate to kill Crassostrea gigas : taxonomy and host alterations*. Dis. Aquat. Organ., **62**(1-2), 65-74.
- Goyard E., Arnaud S., Vonau V., Bishoff V., Mouchel O., Pham D., Wyban J., Boudry P., 2003. *Residual genetic variability in domesticated populations of the Pacific blue shrimp (Litopenaeus stylirostris) of New-Caledonia, French Polynesia and Hawaii and some management recommendations*. Aquat. Living Resour, **16** (2003), 501–508.
- Haure J., Fortin A., Dupuy B., Nourry M., Palvadeau H., Papin M., Péniisson C. et Martin J.L., 2003. *Etude comparative des caractéristiques écophysiological et des performances de croissance de l'huître creuse Crassostrea gigas diploïde et triploïde en milieu contrôlé*. IFREMER, 37p.
- Heidelberg J.F., Eisen J.A., Nelson W.C., Clayton R.A, Gwinn M.L., Dodson R.J., Haft D.H., Hickey E.K., Peterson J.D., Umayam L.I, Gill S.R, Nelson K.E., Read T.D., Tettelin H., Richardson D., Ermolaeva M.D, Vamathevan J., Bass S., Qin H., Dragoi I., Sellers P., McDonald L., Utterback T., Fleishmann R.D., Nierman W.C., White O., Salzberg S.L., Smith H.O., Colwell R.R., Mekalanos J.J., Venter J.C., Fraser C.M., 2000. *DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen Vibrio cholerae*. Nature, **406**, 477-483.
- Hulata G., 2001. *Genetic manipulation in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies*. Genetica, **111**, 155-173.
- Kimbell J.R. et McFall-Ngai M.J., 2003. *The squid-Vibrio symbioses: from demes to genes*. Integr. Comp. Biol., **43**, 254-260.
- Kothary M.H. et Kreger A.S., 1987. *Purification and characterization of an elastolytic protease of Vibrio vulnificus*. J. Gen. Microbiol., **133**, 1783-1791.
- Labreuche Y., Lambert C., Soudant P., Boulo V., Huvet A. et 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.
- Lacoste A., Jalabert F., Malham S., Cueff A., Gélébart F., Cordevant C., Lange M. et Poulet S.A., 2001. *A Vibrio splendidus strain is associated with summer mortality of juvenile oysters Crassostrea gigas in the bay of Morlaix (North Brittany, France)*. Dis. Aquat. Org., **46**, 139-145.
- Labreuche Y., 2006. *Caractérisation de la virulence d'une souche de Vibrio aestuarianus, pathogène l'huître creuse Crassostrea gigas*. Thèse, Université de Bretagne Occidentale, France. 277p.
- Le Roux F., Gay M., Lambert C., Waechter M., Poubalanne S., Chollet B., Nicolas J.-L. et Berthe F., 2002. *Comparative analysis of Vibrio splendidus-related strains isolated during Crassostrea gigas mortality events*. Aquat. Living Resour., **15**, 251-258.
- Le Roux F., Gay M., Lambert C, Nicolas J.L., Gouy M. et Berthe F.C., 2004. *Phylogenetic study and identification of Vibrio splendidus-related strains based on gyrB gene sequences*. Dis. Aquat. Organ., **58**(2-3), 143-150.

- Le Roux F., Goubet A., Thompson F.L., Faury N., Gay M., Swings J. et Saulnier D., 2005. *Vibrio gigantis* sp. nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*). *Int J Syst Evol Microbiol*, **55**, 2251-2255.
- Le Roux F., Binesse J., Saulnier D. et Mazel D., 2007. *Construction of a Vibrio splendidus mutant lacking the metalloprotease gene vsm by use of a novel counterselectable suicide vector*. *Applied and Environmental Microbiology*, 777-784.
- Milton D.L., Norqvist A. et Wolf-Watz, 1992. *Cloning of a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.*, **174**, 7235-7244.
- Miyoshi S. et Shinoda S., 2000. *Microbial metalloproteases and pathogenesis*. *Microbes Infect.*, **2**, 91-98.
- Nell J.A., 2002. *Farming triploid oyster*. *Aquaculture*, **210**, 69-88.
- Nhung P.H., Shah M.M., et al, 2007. *The DnaJ gene as a novel phylogenetic marker for identification of Vibrio species*. *Systematic and Applied Microbiology*, **30**(4), 309-315.
- Normand J., Ernande B., Haure J. et Boudry P., *in prep.* *Comparisons made on diploid and triploid Crassostrea gigas spat from different induction methods: what can we learn about reproduction?*
- Normand J., Le Pennec M. et Boudry P., *in press.* *Gametogenesis in diploid and triploid Pacific Oysters (Crassostrea gigas) reared in an estuarine farming site in France during the 2003 heatwave*.
- Normand J., Ernande B. et Boudry P., 2008. *Genetic basis of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters, Crassostrea gigas*. Acte de conger "Physiomar 08" - Brest, France, - 1-4 Septembre 2008.
- OFIMER (office nationale interprofessionnel des produits de la mer et de l'aquaculture), 2008.
- Quillet E., Boudry P. et Lapègue S., 2007. *Variabilité génétique de la réponse aux organismes pathogènes : un outil pour améliorer la santé des mollusques et poissons d'élevage*. *INRA Prod. Anim.*, **20**(3), 239-252.
- Samain J.F., Dégremont L., Soletchnik P., Haure J., Bédier E., Ropert M., Moal J., Huvet A., Bacca H., Van Wormhoudt A., Delaporte M., Costil K., Pouvreau S., Lambert C., Boulo V., Soudant P., Nicolas J.L., Le Roux F., Renault T., Gagnaire B., Geret F., Boutet I., Burgeot T. et Boudry P., 2007. *Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (Crassostrea gigas) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes*. *Aquaculture*, **268**, 227-243.
- Samain J.F. et McCombie H., 2007. *Mortalités estivales de l'huître creuse Crassostrea gigas*. *Défi Morest*. Ed. Ifremer/Quae, 332p.
- Samain J.F. et McCombie H., 2007a. *Mortalités estivales de l'huître creuse Crassostrea gigas*. *Défi Morest*. Chapitre 6 : Les risques associés aux pathogènes. Ed. Ifremer/Quae, 332p.
- Samain J.F. et McCombie H., 2007b. *Mortalités estivales de l'huître creuse Crassostrea gigas*. *Défi Morest*. Chapitre 5 : Caractérisation phénotypique des souches R Résistantes et S Susceptibles à la mortalité estivale. Ed. Ifremer/Quae, 332p.
- Saulnier D., *in prep.* *Metalloprotease-like activity is a phenotypic marker of virulence of Vibrio strains pathogenic for Crassostrea gigas oyster*.
- Sauvage C., 2008. *Développement de marqueurs moléculaires liés à la résistance à la mortalité estivale de l'huître creuse Crassostrea gigas – Approche QTL*. Thèse, Université de La Rochelle, France. 272p.
- Sbordoni V., De Matthaeis E., Sbordoni M.C., La Rosa G. Et Mattoccia M., 1986. *Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of Panaeus japonicus (Crustacea, Decapoda)*. *Aquaculture*, **57**, 239-251.
- Soletchnik P., Ropert M., Mazurie J., Gildas Fleury P. et Le Coz F., 2007. *Relationships between oyster mortality patterns and environmental data from monitoring databases along the coasts of France*. *Aquaculture*, **271**(1-4), 384-400.
- Sunden S.L.F. et Davis S.K., 1991. *Evaluation of genetic variation in a domestic population of P. vannamei (Boone): a comparison with three natural populations*. *Aquaculture*, **97**, 131-142



- Taris N., 2005. Conséquences génétiques de la production intensive de larves d'huîtres en éclosérie : étude des processus de dérive et de sélection liés aux pratiques d'élevage. Thèse, Université de La Rochelle, France. 205p.
- Thompson F.L., Iida T. et Swings J., 2004. *Biodiversity of vibrios*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **68**(3), 403-431.
- Thompson J.R., Pacocha S., Pharino C., Klepac-Ceraj V., Hunt D.E., Benoit J., Sarma-Rupavtarm R., Distel D.L. et Polz M.F., 2005. Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population. *Science*, 307(5713), 1311-1313.
- Waechter M, Le Roux F, Nicolas J.L., Marissal E. et Berthe F.C., 2002. *Characterization of pathogenic bacteria of the cupped oyster Crassostrea gigas*. *C. R. Biol.*, **325**(3), 231-238.
- Yamaichi Y., Iida T., Park K. S., Yamamoto, K. et Honda T., 1999. *Physical and genetic map of the genome of Vibrio parahaemolyticus : presence of two chromosomes in Vibrio species*. *Mol. Microbiol.*, **31**(5), 1513-1521.