

Laboratoire de Génétique et Pathologie
Station IFREMER La Tremblade
17390 Ronce-Les-Bains

72829
E700.DUP.
C.

Mémoire présenté par Marylise DUPERTHUY

sous la direction du Docteur Denis SAULNIER

Contribution à l'étude de vibrions pathogènes d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*

Interactions hémocytes-vibrions et
développement de tests de diagnostic d'intérêt taxonomique



IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 03727

Mémoire présenté pour l'obtention du :

MASTER 2 Recherche Mention Biochimie
Spécialité Biochimie, Biologie cellulaire et moléculaire, Chimie Bio-organique

UFR Sciences et Technologies

2006 – 2007

Liste des abréviations et définitions

LGP : laboratoire de génétique et pathologie

GFP : Green Fluorescent Protein

EMA : eau de mer artificielle

EMA CF : eau de mer artificielle centrifugée et filtrée

P/Vol : rapport entre le poids et le volume

UFC : unité formant colonie

dNTP : désoxyribonucléotides

qsp : quantité suffisante pour

sec : secondes

min : minutes

PCRq : PCR quantitative

FS : Forward scatter = taille

SS : side scatter = granulométrie

FL1 : fluorochrome 1 (vert)

FL3 : fluorochrome 3 (rouge)

T_m : température de fusion (melting temperature)

C_t : threshold cycle, nombre de cycles de PCR nécessaires à la détection d'une fluorescence dépassant la ligne de base

ECP : extracellular products

Liste des figures

- Figure 1 : Alignement des séquences protéiques déduites des séquences nucléotidiques pour le design des amorces *V. coralliitycus* (m41) après séquençage
- Figure 2 : Cytogrammes de détection des bactéries par cytométrie de flux
- Figure 3 : Cytogramme et histogramme de détection de la souche TR32 en FL1
- Figure 4 : Détection de LGP 32 avec des billes de 4µm
- Figure 5 : Détection de l'hémolymphe par cytométrie de flux - utilisation des billes 4µm
- Figure 6 : Comparaison en FL1 (750) de la souche LGP 32 traitée ou non au Syto9
- Figure 7 : Comparaison en FL1 (750) des événements comptabilisés en « B » d'un pool d'hémolymphe traité ou non au Syto9
- Figure 8 : Comparaison en FL3 (650) de la souche LGP 32 marquée à l'IP préalablement traitée ou non à l'eau oxygénée
- Figure 9 : Marquage à l'IP d'une suspension de LGP32 traité avec 0,3% d'eau oxygéné
- Figure 10 : Courbe d'amplification selon la concentration en ADN matrice de *V. splendidus* avec les amorces ciblant le gène *ARN 16S*. Les concentrations ont été diluées de 10 en 10. La quantité d'ADN matrice avant amplification est comprise entre 10 ng et 1 fg
- Figure 11 : Courbe de dissociation des amplicons générés avec les amorces ciblant le gène *ARN 16S* de *V. splendidus*
- Figure 12 : Courbe d'étalonnage des amplicons générés avec les amorces ciblant le gène *ARN 16S* de *V. splendidus* selon la quantité totale en ADN présente avant amplification
- Figure 13 : Courbe de dissociation des amplicons générés avec les amorces ciblant le gène *gyrB* de *V. aestuarianus*
- Figure 14 : Courbe d'étalonnage des amplicons générés avec les amorces ciblant le gène *gyrB* de *V. aestuarianus* selon la quantité totale en adn présente avant amplification
- Figure 15 : Amplification par PCRq de 10 fg d'ADN de *V. aestuarianus* et profils de dissociation des amplicons selon la concentration finale de chaque amorce sens/antisens exprimée en nM.
- Figure 16 : Amplification par PCRq d'eau afin selon la molarité de chaque amorce afin de minimiser l'apparition des dimères d'amorces.
- Figure 17 : Courbe de dissociation des amplicons générés avec le 1^{er} couple d'amorces ciblant le gène *toxR* de *V. coralliitycus*
- Figure 18 : Courbe de dissociation des amplicons générés avec le 2^{ème} couple d'amorces ciblant le gène *toxR* de *V. coralliitycus*
- Figure 19 : Courbe d'étalonnage des amplicons générés avec le 2^{ème} couple d'amorces ciblant le gène *toxR* de *V. coralliitycus* selon la quantité totale en ADN présente avant amplification
- Figure 20 : Courbe d'amplification du test de spécificité des amorces ciblant le gène *ARN 16S* de *V. splendidus*
- Figure 21 : Courbe de dissociation des amplicons générés par les amorces ciblant le gène *ARN 16S* de *V. splendidus* pour le test de spécificité
- Figure 22 : Courbe d'amplification du test de spécificité des amorces ciblant le gène *gyrB* de *V. aestuarianus*
- Figure 23 : Courbe de dissociation des amplicons générés par les amorces ciblant le gène *gyrB* de *V. aestuarianus* pour le test de spécificité
- Figure 24 : Courbe d'amplification du test de spécificité des amorces ciblant le gène *toxR* de *V. coralliitycus*
- Figure 25 : Courbe de dissociation des amplicons générés par les amorces ciblant le gène *toxR* de *V. coralliitycus* pour le test de spécificité
- Figure 26 : Mortalité hémocytaire détectée en FL3 après incubation avec de l'IP
- Figure 28 : Cytogrammes d'hémolymphe d'huître vivante (a) et morte (b) 2 jours après une infection expérimentale à TR 32
- Figure 29 : Arbre phylogénétique réalisé à partir des alignements de séquences du gène *ARN 16S*. Trente cinq isolats bactériens ont été analysés sur 526 sites nucléotidiques en appliquant la méthode de Neighbour joining

Liste des graphiques

Graphique 1 : Abaque permettant la quantification des bactéries grâce à l'utilisation de billes de 4µm

Graphique 2 : Evolution des différents composants de l'hémolymphe au cours du temps

Graphique 3 : Evolution des composants de l'hémolymphe pendant un contact de 5 heures avec TR32

Graphique 4 : Evolution des composants de l'hémolymphe pendant un contact de 4 heures avec TR32 à différents ratios

Graphique 5 : Evolution des composants de l'hémolymphe après un contact de 4 heures avec *V. tasmaniensis*

Graphique 6 : Survies suite à une infection expérimentale à TR32

Liste des photos

Photo 1 : *ARN 16S* amplifié par PCR de *V.coralliiticyus*

Photo 2 : *rpoD* amplifié par PCR de *V.coralliiticyus*

Photo 3 : *toxR* amplifié par PCR de *V.coralliiticyus*

Photo 4 : Produits d'amplification par PCR de différentes espèces de vibrions avec des amorces ciblant le gène *ARN 16S* de *V. splendidus*

Photo 5 : Produits d'amplification par PCR de différentes espèces de vibrions avec des amorces ciblant le gène *gyrB* de *V. aestuarianus*

Photo 6 : Produits d'amplification par PCR de différentes espèces de vibrions avec des amorces ciblant le gène *toxR* de *V. coralliiticyus*

Photos 7 : Planche photographique d'observations microscopiques en lumière blanche et en

Sommaire

Introduction	1
1. Rappels bibliographiques	2
1.1. Les vibrions	2
1.1.1. Présentation générale.....	2
1.1.2. Les vibrions de l'écosystème marin et de la flore microbienne normale de l'huître creuse	3
1.1.3. Les vibrions associés à des épisodes de mortalité en France	4
1.2. Le système de défense de l'huître	5
2. Objectifs/problématique	6
3. Matériels / Méthodes	7
3.1. Bactériologie	7
3.1.1. Les souches	7
3.1.2. Conditions de culture	8
3.1.3. Cytométrie de flux et microscopie	8
3.1.4. Protocole de dépuración bactériologique des huîtres.....	10
3.1.5. Infections expérimentales avec des vibrions	10
3.2.1. Extraction et purification de l'ADN :	11
3.2.2. Choix des amorces :	11
3.2.3. Préparations des réactifs pour la PCR :	12
3.2.4. Réaction d'amplification :	12
3.2.5. Visualisation des amplicons :	13
3.2.6. Séquençage :	13
3.2.7. PCR quantitative :	14
4. Résultats	16
4.1. Mise au point de méthodologies.....	16
4.1.1. Détection et de quantification des bactéries par cytométrie de flux	16
4.1.2. Analyse de l'hémolymphe de l'huître	17
4.1.3. Evaluation de marqueurs nucléiques.....	18
4.1.4. Effet d'un protocole « de dépuración » des huîtres	20
4.1.5. Essais de détection de trois espèces de Vibrions (en biologie moléculaire) : ..	21
4.2. Applications des développements méthodologiques.....	28
4.2.1. Etude des interactions hôte - pathogène	28
4.2.2. Diagnostic d'espèce de vibron à partir d'isolats bactériens	32
5. Discussions.....	34
5.1. Discussion méthodologique	34
5.2. Discussion des résultats.....	36
Conclusion.....	39
Références bibliographiques :	40

Introduction

L'ostréiculture représente plus de 70% du chiffre d'affaire réalisé par l'aquaculture française et est dominée par l'élevage de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Au niveau mondial, l'élevage de cette espèce d'huître assure 10% de la production en produits d'origine aquacole (poissons, crustacés et mollusques principalement). Dès leur introduction dans les années 1970 sur le littoral français, les populations de *C. gigas* ont subi des épisodes de mortalité s'exprimant durant la saison estivale, qui affectent les jeunes huîtres élevées en milieu naturel sur estran. Ces mortalités ont fait l'objet d'un programme d'étude multidisciplinaire dénommé MOREST arrivé à son terme fin 2005. Les conclusions révèlent que l'étiologie de ces mortalités est multifactorielle et qu'elles sont la résultante d'un ensemble d'évènements impliquant des facteurs de l'environnement, de l'huître et l'intervention d'agents pathogènes.

Deux types de pathogènes ont été identifiés : un virus de type herpès et deux bactéries du genre *Vibrio*, l'un appartenant au groupe polyphylétique *V. splendidus* et l'autre à l'espèce *V. aestuarianus*. Depuis 2006, une autre espèce de vibrion *V. coralliitycus* a été retrouvée pour la première fois en France associée à des mortalités de larves d'huîtres creuses au sein d'une écloserie de larves de *C. gigas*.

Dans une démarche de prévention face à ces vibrions pathogènes sévissant dans les exploitations ostréicoles, au moins deux stratégies peuvent être envisagées. La première consiste à limiter les risques de dissémination ou de développement de l'agent infectieux et la seconde à sélectionner des familles génétiquement résistantes à ces vibrions.

Le présent travail s'inscrit dans cette thématique et a consisté à développer des outils moléculaires de diagnostic rapides et fiables pour ces trois espèces de *Vibrio* pathogènes afin d'être en mesure par le biais d'actions ciblées de limiter leur propagation ou leur développement. La seconde partie s'attache à décrire les interactions existantes entre l'huître et les vibrions et notamment l'étude de la phagocytose des vibrions par les hémocytes de l'huître dans la perspective d'obtenir des critères de sélection génétique d'huîtres résistantes aux agents infectieux.

1. Rappels bibliographiques

1.1. Les vibrions

1.1.1. Présentation générale

Les bactéries du genre *Vibrio* ou vibrions sont des organismes dont le mode de vie est typiquement aquatique et que l'on trouve en abondance dans le milieu marin. D'après la deuxième édition du "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" ce genre appartient à la famille des *Vibrionaceae* qui comprend également les genres *Photobacterium* et *Salinivibrio*. Les vibrions sont des bactéries Gram négatif, droits ou incurvés, de 0,5 à 1 µm de diamètre sur 1,2 à 3,5 µm de longueur. Ils sont généralement mobiles grâce à la présence de flagelles polaires. Ils sont aéro-anaérobies facultatifs, à métabolisme respiratoire et fermentatif, le plus souvent oxydase positive, nitrate réductase positive et chimio-organotrophes.

D'un point de vue génétique le genre *Vibrio* présente la particularité de posséder deux chromosomes circulaires. En effet, ces derniers ont été mis en évidence chez les espèces pathogènes pour l'homme par séquençage complet des génomes de *V. cholerae* (Heidelberg et al. 2000), *V. parahaemolyticus* (Makino et al. 2003) et *V. vulnificus* (Chen et al. 2003) ainsi que chez d'autres espèces de *Vibrio* notamment par électrophorèse en champs pulsé (Yamaichi et al. 1999). Cette partition peut s'expliquer selon deux hypothèses : l'acquisition ancestrale d'un mégaplasmide ou l'excision ancestrale du génome.

Depuis ces trente dernières années le nombre d'espèces nouvellement décrites appartenant au genre *Vibrio* a considérablement augmenté. Ainsi en 1980 seules 20 espèces étaient décrites, contre 54 en 2002 et plus de 70 aujourd'hui (Euzéby 1997). Classiquement l'identification d'espèces était basée sur l'analyse de critères phénotypiques classiques, biochimiques notamment. Cependant, compte tenu d'un nombre croissant de nouvelles espèces, de l'absence de tests phénotypiques discriminants et de la variabilité de réponse d'une même souche à certains tests, la phénotypie est une méthode qui ne permet plus, dans bien des cas, d'identifier avec certitude un isolat bactérien au sein de ce genre.

Aussi les approches moléculaires de caractérisation de l'ADN bactérien sont de plus en plus utilisées comme alternative au phénotypage classique du fait de leur fort pouvoir discriminant, de leur facilité d'exécution et de la fiabilité des données qu'elles génèrent. Elles ont révolutionné la taxonomie bactérienne en permettant notamment l'étude des bactéries non cultivables. A titre d'exemple, le séquençage d'un ou plusieurs gènes conservés d'un point de vue phylogénétique, tel celui codant l'ARN ribosomal, est l'une des techniques les plus utilisées. La comparaison des séquences nucléotidiques obtenues chez différentes souches permet après alignement d'établir les relations phylogénétiques entre souches. Classiquement toutes les souches *Vibrio* appartenant à une même espèce ont plus de 97 % d'homologie dans leur séquence 16S tandis que le genre *Vibrio* est défini par plus de 95 % d'homologie (Kita-Tsukamoto et al. 1993; Hagstrom et al. 2002). Cette méthode est congruente avec l'hybridation ADN / ADN qui est la technique de référence en taxonomie des procaryotes (Wayne et al. 1987).

1.1.2. Les vibrions de l'écosystème marin et de la flore microbienne normale de l'huître creuse

L'écosystème marin regorge de bactéries Gram négatives et notamment, un grand nombre de ces bactéries appartiennent au genre *Vibrio*. Ces bactéries sont ubiquitaires. Elles sont présentes à l'état libre (planctoniques) ou associées à la quasi totalité des animaux aquatiques et chez les mollusques en particulier (Thompson et al. 2004a; Thompson et al. 2006).

Le genre *Vibrio* est le genre cultivable majoritaire de la microflore normale de l'huître creuse même si les genres *Achromobacter*, *Flavobacterium* et *Pseudomonas* sont également représentés (Colwell et al. 1960; Prieur 1981b; Prieur 1981a). Certaines espèces ont notamment été isolées de l'hémolymphe d'huître creuses *Crassostrea gigas* telles que *V. gigantis* (Le Roux et al. 2005) et *V. crassostrae* (Faury et al. 2004) décrites pour la première fois au Laboratoire de Génétique et Pathologie de la Tremblade. Ces bactéries sont retrouvées dans l'hémolymphe et également dans d'autres tissus de l'huître.

Si la plupart des vibrions sont des bactéries commensales de nombreux hôtes marins et même symbiontes (association *V. harveyi* et calmar *Euprymna scolopes*, (Visick 2005)), certains de ces vibrions sont des pathogènes d'animaux marins tels que *V. splendidus*, responsable de septicémies et d'ulcères de la peau chez la majorité des poissons marins (Austin et al. 1999), ou *V. tapetis* responsable de la maladie de l'anneau brun chez la palourde (Borrego et al. 1996).

1.1.3. Les vibrions associés à des épisodes de mortalité en France

Certains vibrions sont associés à des épisodes de mortalités massives de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, qui sévissent de façon saisonnière durant la période estivale en affectant principalement les populations d'huîtres juvéniles élevées sur estran. C'est le cas des espèces *V. splendidus* et *V. aestuarianus* souvent associées aux mortalités d'huîtres et pour lesquelles de nombreuses souches expriment un pouvoir pathogène en infection expérimentale (Lacoste et al. 2001; Waechter et al. 2002; Gay et al. 2004b; Le Roux et al. 2004).

Un autre épisode de mortalité anormale a fait son apparition en 2006 dans au moins une écloserie d'huître *C. gigas* avec des mortalités massives de larves et de micro naissains. Les animaux ont été retrouvés infectés par une autre espèce de vibrion, *V. coralliitycus*, très proche d'un point de vue phylogénétique de *V. tubiashii*. Ce dernier vibrion responsable d'une nécrose bacillaire des larves a été associé à des mortalités sévissant dans les élevages d'huître *C. virginica* et *C. gigas* aux Etats Unis (Elston et al. 1980; Takahashi et al. 2000). Les infections expérimentales réalisées sur larves avec des souches *V. coralliitycus* ont révélés un pouvoir pathogène élevé (JL Nicolas, pers com.). Si cette nouvelle maladie dont l'étiologie semble être due à *V. coralliitycus* venait à se reproduire (émergence) il serait particulièrement utile de la diagnostiquer de façon précoce afin d'en limiter les effets et d'infirmier ou confirmer le rôle de *V. coralliitycus*. En effet les larves produites en écloserie sont ensuite fournies à de nombreux éleveurs, les risques de dissémination du pathogène et de propagation de la maladie sont par conséquent très élevés en l'absence d'outils diagnostiques performants.

La plupart de ces mortalités peuvent être également reliées à des facteurs environnementaux tels que la salinité, la température de l'eau où la disponibilité en nutriments agissant sur le pathogène lui même (Armada et al. 2003) où à un ensemble de facteurs interagissant en intégrant l'hôte (physiologie, déterminisme génétique,...) comme cela est la cas pour les mortalités estivales d'huître creuse *C. gigas* en France (Soletchnik et al. 1998). Dans ces conditions les vibrions précités apparaissent d'avantage comme des opportunistes que comme des agents pathogènes stricts.

Dans ce contexte, l'étude des interactions huître – vibrion revêt un intérêt considérable, la maladie étant la résultante notamment de facteurs de virulence exprimés par ces pathogènes (production de toxines, pouvoir de colonisation et de multiplication,...) et de la capacité de défense de l'hôte.

1.2. Le système de défense de l'huître

Le système immunitaire de l'huître est dans l'état actuel des connaissances inné et donc non adaptatif, c'est à dire qu'il ne semble pas faire intervenir de processus de mémorisation de la réponse immunitaire. Il est communément distingué en deux types de réactions, l'une à médiation cellulaire et l'autre à médiation humorale.

La réponse cellulaire est assurée par les hémocytes qui se déplacent librement dans le système circulatoire de l'huître et migrent dans les tissus sous l'action de stimuli chimiotactiques (Howland et al. 1982). Ce système circulatoire présente en outre la particularité d'être semi ouvert et non spécialisé en artère et veine. Deux types d'hémocytes sont distingués dans l'hémolymph : ceux très riches en granules, les granulocytes, et ceux qui en ont peu ou pas, les hyalinocytes (Cheng 1981). En l'état actuel des connaissances les hémocytes sont les seules cellules douées de capacité de défense vis à vis des bioagresseurs (bactéries, virus, parasites) aussi bien chez les mollusques que chez les crustacés. Cette stratégie de défense repose principalement sur un système de phagocytose très actif assuré essentiellement par les granulocytes et sur des mécanismes d'encapsulation de corps étrangers de grande taille du fait de la migration des hémocytes avec par la suite formation d'un tissu fibreux. Les hyalinocytes semblent pour leur part être davantage impliqués dans les processus de réparation tissulaire (Hine 1999; Chu 2000).

En parallèle de ce système de défense cellulaire, on retrouve un système à médiation humorale qui fait intervenir des molécules effectrices solubles tels que les inhibiteurs de protéases (Montagnani et al. 2007), les peptides antimicrobiens (Gueguen et al. 2006; Gonzalez et al. 2007), des molécules de reconnaissances telles des lectines (Pipe 1990), des enzymes hydrolytiques d'origine lysosomiale et probablement un système d'activation de la prophénoloxydase par analogie avec celui bien caractérisé chez les arthropodes (Soderhall et al. 1983; Gonzalez et al. 2007).

2. Objectifs/problématique

De nombreuses espèces et souches de vibrions sont associées à des épisodes de mortalité dans les élevages aquacoles partout dans le monde. Ces espèces sont dans la plupart des cas difficiles à identifier par les méthodes classiques utilisées en taxonomie bactérienne telles le phénotypage sur leurs caractéristiques biochimiques. Les méthodes de biologie moléculaire permettent à présent de développer des outils de diagnostic rapides et fiables vis-à-vis des agents infectieux incriminés et d'envisager des actions de lutte adaptées. En effet les risques de dissémination d'un agent infectieux dans des milieux ouverts, aquatiques, et au sein d'une filière nécessitant de nombreux échanges et transferts d'animaux vivants paraissent très élevés. Les retombées économiques des pertes engendrées par une dissémination /développement d'un agent infectieux peuvent être énormes et de grande envergure. A titre d'exemple l'apparition du parasite *Bonamia* sur les cotes française suite à un transfert d'huîtres infectées provenant des Etats-Unis dans les années 1970 est à l'origine de l'effondrement de la filière de production d'huître plate *Ostrea edulis*. Une détection précoce des pathogènes requiert par conséquent un enjeu considérable afin d'en limiter les effets.

En cas d'apparition ou d'installation d'un pathogène des traitements curatifs utilisant des produits médicamenteux peuvent être envisagés. Cependant ils sont d'utilisation délicate en aquaculture du fait que les animaux sont élevés dans des systèmes ouverts, qu'ils présentent souvent une toxicité pour les animaux et l'environnement et qu'ils peuvent engendrer des problèmes de santé publique comme dans le cas des antibiotiques, dont l'abus est la cause du développement de souches bactériennes antibiorésistantes.

C'est la raison pour laquelle il apparaît également important outre les progrès en diagnostic de mieux comprendre les relations existantes entre les agents pathogènes et leur hôte. Une stratégie de lutte pouvant être ensuite celle de sélectionner des animaux sur une meilleure capacité de résistance aux agents infectieux. La compréhension de ces relations comprend l'étude et la caractérisation des interactions entre les cellules immunocompétentes de l'huître et un agent infectieux, le vibrion.

Dans ce contexte il semblait particulièrement intéressant d'un point de vue fondamental et appliqué de :

- **Développer de nouveaux outils de détection spécifiques de vibrions d'huître creuse**
- **Caractériser les interactions entre les vibrions et les hémocytes d'huître**

3. Matériels / Méthodes

3.1. Bactériologie

3.1.1. Les souches

La souche LGP32 appartient à l'espèce *Vibrio splendidus*. Elle a été isolée dans un contexte de mortalité estivale d'huître creuse lors d'expérimentations réalisées en aquarium. Brièvement, des huîtres d'apparence saine collectées en 2001 sur différents sites de la façade atlantique à proximité d'huîtres subissant des mortalités estivales, ont été transférées au LGP. Ces dernières ont été mises en contact avec d'autres huîtres élevées au LGP (huîtres sentinelles) et n'ayant jamais rencontré d'épisodes de mortalité. Dans 9 cas sur 12 selon la provenance des animaux, une mortalité significative a été observée 8 jours post cohabitation chez les animaux sentinelles (Gay et al. 2004a). La souche LGP32 a été isolée à partir de l'hémolymphe d'un animal sentinelle moribond suite au contact avec des animaux provenant de Fouras située à proximité de La Rochelle. Cette souche est l'une des plus virulente qui ait été isolée lors de ces expérimentations. Un modèle d'infection expérimentale reproductible a pu être obtenu (Gay et al. 2004b). Le génome de cette souche a été totalement séquencé en 2006 à l'Institut Pasteur de Paris.

La souche TR32 correspond à la souche LGP32 qui a été muté en intégrant au niveau chromosomique le gène codant une protéine fluorescente en vert (la GFP) ainsi qu'un gène codant une acétyl transférase (CAT) responsable de la résistance vis à vis du chloramphénicol. Cette mutation a été rendue possible par la mise au point d'une stratégie de génétique inverse chez cette espèce de *Vibrio* (Le Roux et al. 2007).

La souche LMG 20012 est la souche type de *V. tasmaniensis* une espèce apparentée à *V. splendidus*. Cette souche a été isolée d'un saumon en Tasmanie. Bien que très proche de LGP32 d'un point de vue phylogénétique, cette souche est dénuée de tout pouvoir pathogène en infection expérimentale.

Autres souches de *Vibrio* présentées en annexe 1.

3.1.2. Conditions de culture

Les cultures de vibrions sont réalisées sur milieu Zobell (extrait de levure 0,1% P/Vol, Bio-Rad ; pastone 0,4% P/Vol Bio-rad) dilué en eau de mer artificielle (EMA, NaCl 23,4% P/vol , KCl (1,5g/l) , MgSO₄ 7H₂O (1,2 g/l) ; CaCl₂ 2H₂O (0,2 g/l)) liquide ou solide (Agar Agar 1,5% P/vol Bio-Rad), seul ou additionné de chloramphénicol à la concentration finale de 12,5µg/mL (Annexe2).

Les cultures en milieu liquide sont réalisées en tube Greiner 15ml stérile rempli de Zobell liquide dans lequel on inocule à l'anse stérile une colonie. Les tubes sont incubés à 20°C sous agitation durant une nuit jusqu'à saturation de la croissance bactérienne (phase de plateau). La revivification des souches bactériennes ainsi que les dénombrements bactériens sont réalisés sur boîte de Pétri coulées en milieu Zobell additionné d'Agar Agar. Les souches bactériennes sont conservées à -80°C en milieu glycérolé. Les dénombrements bactériens sont réalisés après dilution successive d'une suspension bactérienne à saturation de concentration théorique 2.10^9 UFC/mL sur boîte en milieu solide. Après ensemencement, les boîtes de Pétri sont incubées à 20°C au moins 24 heures et les colonies bactériennes dénombrées. Une estimation de la concentration bactérienne est réalisée au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 600nm. La comparaison des deux techniques de dénombrement permet d'établir qu'une Densité Optique (D.O.) égale à 1 correspond à une concentration bactérienne de 2.10^9 UFC/mL.

3.1.3. Cytométrie de flux et microscopie

Préparation des échantillons

Les suspensions bactériennes sont centrifugées à 3200g pendant 15 min à température ambiante. Le surnageant est éliminé et le culot bactérien repris dans de l'EMA préalablement centrifugée (3200g 15min) et filtrée 0.22µm.

Les prélèvements d'hémolymphe sont réalisés au niveau du muscle adducteur de l'huître à l'aide d'une seringue de 1ml munie d'une aiguille 23G. Pour l'accès au muscle les huîtres peuvent être anesthésiées dans un bain de 3L de $MgCl_2$ (80g/L) additionné de 2L d'eau de mer filtré au moins 4 heures. Une autre technique consiste à briser la coquille à l'aide d'une pince sur la face postérieure.

L'hémolymphe est ensuite versée dans un tube Greiner de 15 ml et conservée sur glace afin de limiter l'agrégation des cellules.

Observation en microscopie

Une observation microscopique en épifluorescence des vibrions peut être réalisée afin de vérifier le caractère fluorescent (GFP) des TR32, d'apprécier la capacité des hémocytes à phagocyter des bactéries fluorescentes ou d'évaluer le marquage des cellules par des fluorochromes.

Traitements appliqués à la cytométrie

Pour une utilisation optimale du cytomètre de flux (principe en Annexe3), les diluants utilisés sont au préalable centrifugés voire filtrés à $0.22\mu m$.

Pour la quantification des bactéries, des billes $4\mu m$ préalablement soniquées à la concentration de $3.10^7/mL$ (déterminée sur cellule de Malassez) sont utilisées. Concernant l'hémolymphe les billes à $3.10^7/mL$ sont utilisées au $1/400^{\text{ème}}$ final.

Les bactéries et les hémocytes peuvent être marquées grâce à des fluorochromes s'intercalant au niveau de l'ADN. Le Syto9 (Molecular probes) est utilisé à raison de 0,15% à partir d'une solution à 1,67mM. L'iodure de prodidium (IP) 1.5mM est utilisé à 0,8 % (Vol/Vol) pour les bactéries et à 5 % pour les hémocytes. Dans le cas des hémocytes un protocole de détection par cytométrie de flux a été établi et est disponible au LGP (Gagnaire et al. 2006). Les échantillons marqués au Syto9 ou à l'IP doivent être incubés 15 min à l'obscurité avant la lecture au cytomètre.

3.1.4. Protocole de dépuration bactériologique des huîtres

La dépuration de l'eau est réalisée dans les installations expérimentales du LGP. Une fois pompée l'eau de mer est décantée dans des bassins extérieurs, filtrée sur lit de sable et thermo régulée à 17°C à l'aide d'un échangeur thermique. Une ponction individuelle d'hémolymphe est réalisée avant dépuration puis après 7 jours de stabulation des huîtres dans des bacs de 300L alimentés de façon continue en eau dépurée et munis d'un aérateur. Ces échantillons sont ensuite étalés sur boîte de Pétri afin d'effectuer un dénombrement bactérien à 24h et 48h.

3.1.5. Infections expérimentales avec des vibrions

Après anesthésie, l'infection est réalisée par injection intramusculaire de 100µL d'une suspension bactérienne dont la concentration a été évaluée par mesure spectrophotométrique. Les animaux témoins sont injectés avec de l'eau de mer artificielle stérile. Les huîtres sont ensuite maintenues dans des aquariums de 2 à 3 L munis d'un système de bullage, en eau stagnante régulée à 20°C.

Le suivi s'effectue sur une durée de 5 à 7 jours grâce à des passages réguliers afin de décompter et de retirer les huîtres mortes qui s'entrouvrent et ne présentent plus de tonacité musculaire.

Tout au long de ce suivi, les effluents et le matériel sont traités avec des bains de chlore afin d'éviter toute dissémination des bactéries utilisées lors de l'infection dans l'environnement. Une fois le suivi terminé, les animaux sont détruits par autoclavage.

Au cours du suivi de mortalité quelques huîtres ont été régulièrement sélectionnées selon leur statut : vivantes, moribondes, fraîchement mortes.

Différents tissus ont été prélevés :

- L'hémolymphe au niveau du muscle adducteur ou dans la cavité péricardique
- Une portion de muscle adducteur et de masse viscérale qui a ensuite été plongée dans un fixateur de Davidson devant permettre des travaux d'histologie.

	10	20	30	40	50
Vibrio vulnificus	IAKRIEDGIN	QVQSSVAEYP	GTIPYILEQF	DKVQAEELRL	TDLISGFVDP	
Vibrio fischeri	IAKRIEEGIN	EVQCSVAEFP	GAISYLLEQF	DKVQTEEIRL	TDIISGFVDP	
Vibrio vulnificus	IAKRIEDGIN	QVQSSVAEYP	GTIPYILEQF	DKVQAEELRL	TDLISGFVDP	
Vibrio tasmaniensis	-----	-----	-----	-----	-----	
Vibrio splendidus	-----	-----	-----	-----	-----	
Vibrio crassostreae	-----	-----	-----	-----	-----	
Vibrio gigantis	-----	-----	-----	-----	-----	
Vibrio pomeroyi	-----	-----	-----	-----	-----	
m41 06210	IAKRIEDGIN	QVQNAVAEYP	GTIPYILEQF	DKVQAEELRL	TDLITGFVDP	
	60	70	80	90	100
Vibrio vulnificus CM	NADETAAPTA	THIGSELAES	DLEDEDNTDI	DDEDEDEDED	GDSSSDSEED	
Vibrio fischeri ES11	NDDGSSAPTA	THIGSELSES	ELDDED----	---DEDAEXN	X----EEEEED	
Vibrio vulnificus CM	NADETAAPTA	THIGSELAES	DLEDEDNTDI	DDEDEDEDED	GDSSSDSEED	
Vibrio tasmaniensiss	-----	-----	-----	-----	-----	
Vibrio splendidusstr	-----	-----	-----	-----	-----	
Vibrio crassostreae	-----	-----	-----	-----	-----	
Vibrio gigantis stra	-----	-----	-----	-----	-----	
Vibrio pomeroyi stra	-----	-----	-----	-----	-----	
m41 06210	DADETAAPTA	THIGSELAES	DLEDED~~~~	~AEEEDAES	DD~~DEEEED	
	110	120	130	140	150
Vibrio vulnificus CM	VGIDPEMALE	KFTQLRNSYQ	NLQLAVNEHG	RESAQTAQAH	ELMLDVFKEF	
Vibrio fischeri ES11	AGIDPELALE	KFTELRRTSYH	NMQLAFEEFG	RDDAKSREAI	GELTDIFREF	
Vibrio vulnificus CM	VGIDPEMALE	KFTQLRNSYQ	NLQLAVNEHG	RESAQTAQAH	ELMLDVFKEF	
Vibrio tasmaniensiss	TGIDPELALE	KFTALRRTSYQ	NRQLAINEYG	HESPKATLAT	TMMQDVFKEF	
Vibrio splendidusstr	TGIDPELALE	KFTALRRTSYQ	NRQLAINEYG	HESPKATLAT	TMMQDVFKEF	
Vibrio crassostreae	TGIDPELALE	KFTALRRTSYQ	NRQLAINEYG	HESPKATLAT	TMMQDVFKEF	
Vibrio gigantis stra	TGIDPELALE	KFTALRRTSYQ	NRQLAINEYG	HESPKATLAT	TMMQDVFKEF	
Vibrio pomeroyi stra	TGIDPELALE	KFTALRRTSYQ	NRQLAINEYG	HESPKATLAT	TMMQDVFKEF	
m41 06210	TGIDPELALE	KFTALRNTFQ	NYQLACNEYG	NESPKATLAH	EMVIDVFKEF	
	160	170	180	190	200
Vibrio vulnificus CM	RLTPKQFDHL	VNELRTAMDR	VRTQERLIMK	SAVEIAKMPK	KSFIALFTGN	
Vibrio fischeri ES11	KLIPKQFDYL	VKEMRDGMDR	VRTQERLIMR	MCVEYGGKMPK	KSFIALFTGN	
Vibrio vulnificus CM	RLTPKQFDHL	VNELRTAMDR	VRTQERLIMK	SAVEIAKMPK	KSFIALFTGN	
Vibrio tasmaniensiss	RLTPKQFDYL	VNELRTSMDR	VRTQERLIMR	QTVEYGGKMPK	KSFIALFTGN	
Vibrio splendidusstr	RLTPKQFDYL	VNELRTSMDR	VRTQERLIMR	QTVEYGGKMPK	KSFIALFTGN	
Vibrio crassostreae	RLTPKQFDYL	VNELRNSMDR	VRTQERLIMR	QTVEYGGKMPK	KSFIALFTGN	
Vibrio gigantis stra	RLTPKQFDYL	VNELRNSMDR	VRTQERLIMR	QTVEYGGKMPK	KSFIALFTGN	
Vibrio pomeroyi stra	RLTPKQFDYL	VNELRNSMDR	VRTQERLIMR	QTVEYGGKMPK	KSFIALFTGN	
m41 06210	RLTPKQFDYL	VEELRASMER	VRTQERLIMK	ASVEYGGKMPK	KSFITLFTGN	
	210	220	230	240	250
Vibrio vulnificus	ESNEEWLDQI	LASDKPYVEK	IKLHEEDIRR	SIAKLRAIEE	ETSLSVNNXQ	
Vibrio fischeri	ESSEWDFNEI	MASDKPYVER	LQRYEEDIRR	SIAKLDSIEK	ETGLPVEN-X	
Vibrio vulnificus	ESNEEWLDQI	LASDKPYVEK	IKLHEEDIRR	SIAKLRAIEE	ETSLSVNNXQ	
Vibrio tasmaniensis	ESSEAWLDEV	LASDKPYAEK	IKRNEHDIRR	SIQKLDIIER	ETSLTVQXSXQ	
Vibrio splendidus	ESSEAWLDEV	LASDKPYAEK	IKRNEHDIRR	SIQKLDIIER	ETSLTVQXSXQ	
Vibrio crassostreae	ESSEAWLDEV	LASDKPYAEK	IKRNEHDIRR	SIQKLDIIER	ETSLTVQXSXQ	
Vibrio gigantis	ESSEAWLDEV	LASDKPYAEK	IKRNEHDIRR	SIQKLDIIER	ETSLTVQXSXQ	
Vibrio pomeroyi	ESSEAWLDEV	LASDKPYAEK	IKRNENDIRR	SIQKLDMIEK	ETSLTVQS-X	
m41 06210	ESSEAWLD..	

Figure 1 : Alignement des séquences protéiques déduites des séquences nucléotidiques pour le design des amorces *V. coralliitycus* (m41) après séquençage

3.2. Protocoles de détection de *Vibrio* pathogènes d'huîtres par PCR

3.2.1. Extraction et purification de l'ADN :

L'extraction de l'ADN des vibrions s'effectue à partir d'une culture pure effectuée en milieu Zobell liquide. Cent μL de cette culture sont déposées sur papier FTA (Whatman)(Annexe 4). Le papier FTA est imprégné de substances chimiques qui permettent la lyse de la cellule et la dénaturation des protéines. Les acides nucléiques sont immobilisés et stabilisés sur le papier grâce à des fibres de cellulose qui permettent une conservation prolongée à température ambiante (plusieurs années). Le papier FTA protège les acides nucléiques des réactions d'oxydation, des UV et des micro-organismes.

Un indicateur coloré permet de vérifier la qualité du dépôt (passage du rose au blanc). Le papier FTA est ensuite laissé sous la hotte à flux laminaire pendant une heure afin de sécher le dépôt avant de le conserver dans une enveloppe prévue à cet effet en présence de desséquant. Un confetti est réalisé à l'aide d'un emporte-pièce de 1,25 mm de diamètre. Des séries de lavages sont ensuite effectuées afin d'éliminer tous les débris cellulaires et inhibiteurs de la polymérase contenus dans ce disque. Le confetti peut être utilisée soit directement en l'ajoutant dans le tube à PCR soit en procédant à une élution afin de se débarrasser de la membrane (cf. PCR quantitative). L'élution est réalisée dans 35 μL de tampon NaOH-EDTA puis l'excès de tampon est neutralisé dans 65 μL de solution Tris-HCl.

3.2.2. Choix des amorces :

Le design des amorces est une étape clé pour l'utilisation de la PCR en diagnostic. En effet, il est nécessaire que la séquence cible soit spécifique de l'agent pathogène recherché. Plusieurs séquences de gènes conservés ont été recherchées dans les bases de donnée ou obtenues dans le cadre de ce travail par séquençage. Ces séquences nucléotidiques ont été alignés à l'aide du programme Bioedit en prenant soin d'intégrer non seulement les séquences de souches d'intérêt mais d'autres provenant d'autres espèces de vibron (Figure 1).

Compte tenu des applications futures souhaitées en PCR quantitative et combinatoire, nous avons recherché des couples d'amorces fonctionnant toutes à la même température d'hybridation, ciblant des gènes d'intérêt phylogénétique différents, générant des amplicons de taille différente, et compatibles pour des applications en PCR quantitative.

Les gènes d'intérêt phylogénétique sélectionnés sont les gènes:

- *ARN 16S* codant la sous unité ribosomale 16S,
- *gyrB* codant une hélicase nécessaire à la réplication des 2 chromosomes bactériens,
- *toxR* codant une protéine transmembranaire intervenant dans la régulation de la transcription de gènes, notamment ceux impliqués dans la virulence, chez quelques vibron.

En effet un grand nombre de séquences sont disponibles dans les banques de données (GenBank) concernant ces trois gènes

3.2.3. Préparations des réactifs pour la PCR :

Le volume réactionnel total de la PCR réalisée dans des plaques à 96 puits est de 50µl. Un mélange ou « prémix » est réalisé nécessaire à « n » réactions PCR, à l'exception des échantillons d'ADN. Les concentrations finales de chacun des réactifs sont les suivantes :

Tampon 10 x (New England Biolabs) :	1x
MgCl ₂ (New England Biolabs) :	2,5 mM
dNTPs (Fermentas)	0,2 mM
Amorces sens (Eurogentec)	0,1 µM
Amorces antisens (Eurogentec)	0,1 µM
Taq polymerase	2 à 4 unités / vol total

3.2.4. Réaction d'amplification :

Les réactions de PCR sont réalisées dans un thermocycleur (PTC-100, MJ Research) en procédant à une dénaturation initiale des échantillons d'ADN à 94°C pendant 3 min, suivie de 35 cycles successifs d'amplification (30 secondes à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 60°C et 30 secondes d'élongation à 72°C) et enfin une étape d'élongation finale des fragments d'ADN à 72°C pendant 5 min.

3.2.5. Visualisation des amplicons :

Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse en ayant préparé un gel d'agarose à 1.5% (poids/volume) contenant 0.5µg/mL de bromure d'éthidium et préparé en tampon TAE 1x. Les échantillons sont mélangés en tampon de charge (0.25 % de bleu de bromophénol et 30 % de glycerol) à raison de 2µL de tampon pour 10µL de produit de PCR puis déposés dans les puits du gel ainsi que des marqueurs de taille disponibles commercialement (Eurogentec). Après une électrophorèse à 110 Volts pendant 30 à 50 min, le gel est observé sous lumière UV pour permettre une visualisation des amplicons.

3.2.6. Séquençage :

La réaction de séquençage (Gibson et al. 2004) a été réalisée sur les gènes *rpoD* qui code un facteur sigma de transcription, *toxR*, et *ARN 16S* de *V coralliitycus* qui ont été amplifiés par PCR en utilisant des amorces universelles (*ARN 16S*) ou dégénérées (*toxR* et *rpoD*). Les conditions de PCR sont équivalentes à celles présentées précédemment à l'exception de la concentration en amorces, pour celles qui sont dégénérées, utilisées à 0,5 µM finale et du programme d'amplification : 3 min à 94° C suivis de 35 cycles : 1 min à 94°C, 1 min à 50°C (*toxR* ou *rpoD*) ou à 58°C (*ARN 16S*), 2 min à 72°C ; et enfin d'une élongation terminale à 72°C pendant 10 min. Après contrôle sur gel d'agarose de la présence d'un seul amplicon de la taille souhaitée pour chaque échantillon, les amplicons sont purifiés sur colonne à l'aide d'un kit « Genomics » (Millipore). Les amplicons sont ensuite élués en présence d'eau et la qualité de la purification ainsi que la concentration évaluées sur gel d'agarose en utilisant un marqueur de taille de concentration connue. Les échantillons d'ADN sont conservés à -20°C en vue du séquençage.

Le principe de la réaction de séquençage consiste à générer une multitude de fragments d'ADN copies conformes de l'ADN matrice mais de toutes tailles possibles afin d'être en mesure de déterminer leurs séquences nucléotidiques après migration électrophorétique. Pour ce faire on utilise une polymérase, une amorce spécifique de l'ADN matrice et des dNTPs mélangés à des didésoxyribonucléotides (ddNTPs) qui ont la propriété de bloquer la synthèse d'ADN lorsqu'ils sont incorporés par la polymérase.

Le volume réactionnel total de la réaction de séquençage dans des plaques à 96 puits est de 20µl. Un mélange ou « prémix » est réalisé nécessaire à « n » réactions, à l'exception des échantillons d'ADN.

Les volumes et concentrations initiales (entre parenthèse) de chacun des réactifs sont les suivantes :

H ₂ O (Sigma)	20 µl qsp
Tampon pour séquençage (Applied Biosystems) :	1,8 µl
Mix de séquençage Bdv3 (Applied Biosystems) :	0,4 µl
Amorce (Eurogentec)	1,5 µl (5 µM)

Dans chaque puits de la plaque pour séquençage sont ajoutés 20 à 100 ng d'ADN (6,3 µl maximum). La réaction de séquence est réalisée dans un thermocycleur « PCR system 2700 » d'Applied Biosystems selon le programme suivant : 25 cycles à 96°C pendant 10 sec, 50°C 5 sec et 60°C 4 min (protocole Annexe 5).

Cinq µL d'EDTA à 125mM sont ensuite ajoutés dans chaque puits et les produits de séquençage sont précipités à l'éthanol absolu pendant 15 min puis à 70%. Une fois les précipités séchés ils sont repris dans 10 µL de formamide et placés à 4°C pendant 30 min. Ensuite la dénaturation est réalisée dans un thermocycleur « PCR system 2700 » à 96°C durant 6min puis refroidie rapidement sur glace avant d'être placée dans le séquenceur automatique à 16 capillaires « ABI prism 3100-Avant » d'Applied Biosystems. Une fois les séquences obtenues en utilisant le programme « Sequencing analysis » les incertitudes voire les erreurs sont corrigées par nos soins.

3.2.7.PCR quantitative :

La PCR quantitative (PCRq) repose sur l'analyse de la cinétique de la réaction de PCR qui peut être décomposée en deux parties : une phase exponentielle et une phase de plateau. La PCR classique nous permet de voir des produits ayant atteint la phase de plateau alors que la PCRq exploite la phase exponentielle de l'amplification. A partir d'une molécule d'ADN, après n cycles de PCR, on obtient théoriquement 2ⁿ copies d'ADN. Le nombre de copies d'ADN est quantifié grâce à l'utilisation d'un fluorochrome se liant à l'ADN (Bogard et al. 1998; Gibson et al. 2004)

Les amorces utilisées doivent être pauvres en bases G et C (40 à 60%), leurs points de fusion respectifs (MT) doivent être proches (moins de 2°C de différence) aux environs de 60°C, ne pas s'hybrider entre elles (dimères), générer des petits fragments (<300 pb) et, dans notre cas, elles doivent être spécifiques de l'espèce de vibron recherchée.

Des triplicats et des témoins négatifs (eau ultra pure) sont également réalisés.

Préparation du mix et concentrations initiales (entre parenthèses):

Full velocity polymerase (Statagene)	12,5 µl
Amorce sens (Eurogentec)	2,5 µl (2 µM classiquement)
Amorce antisens (Eurogentec)	2,5 µl (2 µM classiquement)
H ₂ O (Sigma)	2,5 µl

Ensuite 5µl d'ADN extrait par la méthode conventionnelle (phénol-chloroforme) ou sur papier FTA après élution sont ajoutés à ce mix. Une centrifugation brève de la plaque permet de mettre les divers échantillons au fond du puits afin d'éviter toute contamination pouvant être liée à l'ouverture des bouchons.

L'analyse est ensuite effectuée avec l'appareil MxPro3000 de chez Stratagène et les résultats analysés à l'aide du logiciel fourni par stratagène.

Les cycles de PCR réalisés sont les suivants : la dénaturation initiale se fait à 94°C pendant 10 min. Ensuite 40 cycles sont effectués comme suit : 94°C pendant 10 secondes puis 60°C (T_m des amorces) pendant 30 secondes. Pour cette technique de PCR quantitative, il n'y a pas de phase d'élongation, celle-ci s'effectuant à la température d'hybridation (60°C), du fait des caractéristiques de la « full velocity » polymérase. Des triplicats et des témoins réalisés avec de l'eau comme échantillon sont également effectués.

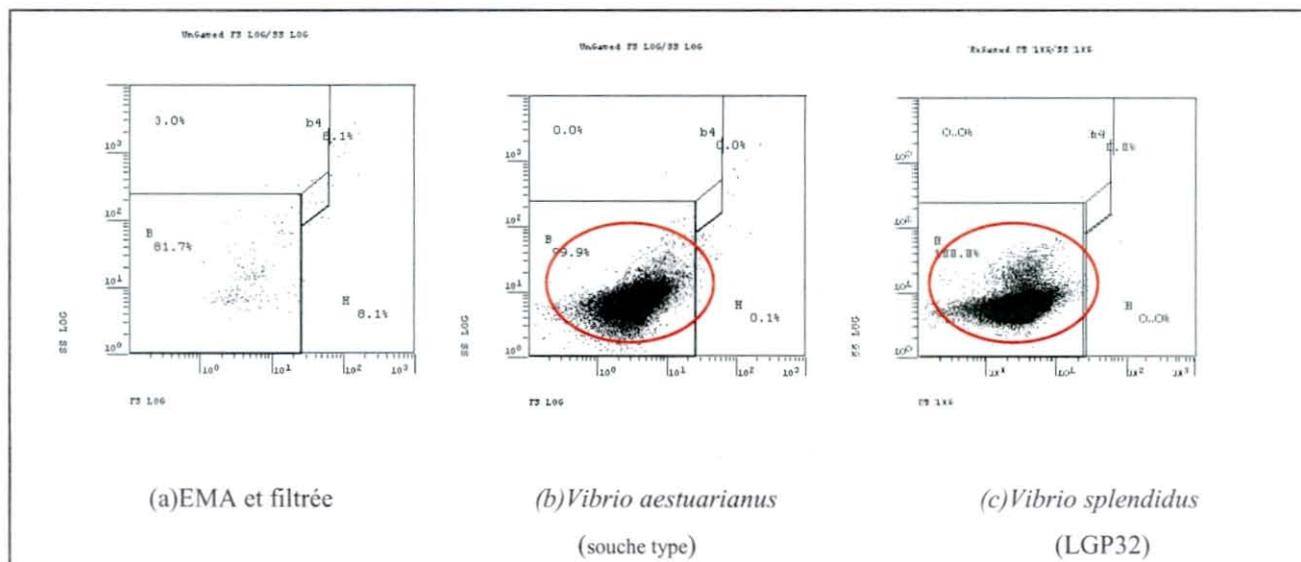


Figure 2 : Cytogrammes de détection des bactéries par cytométrie de flux

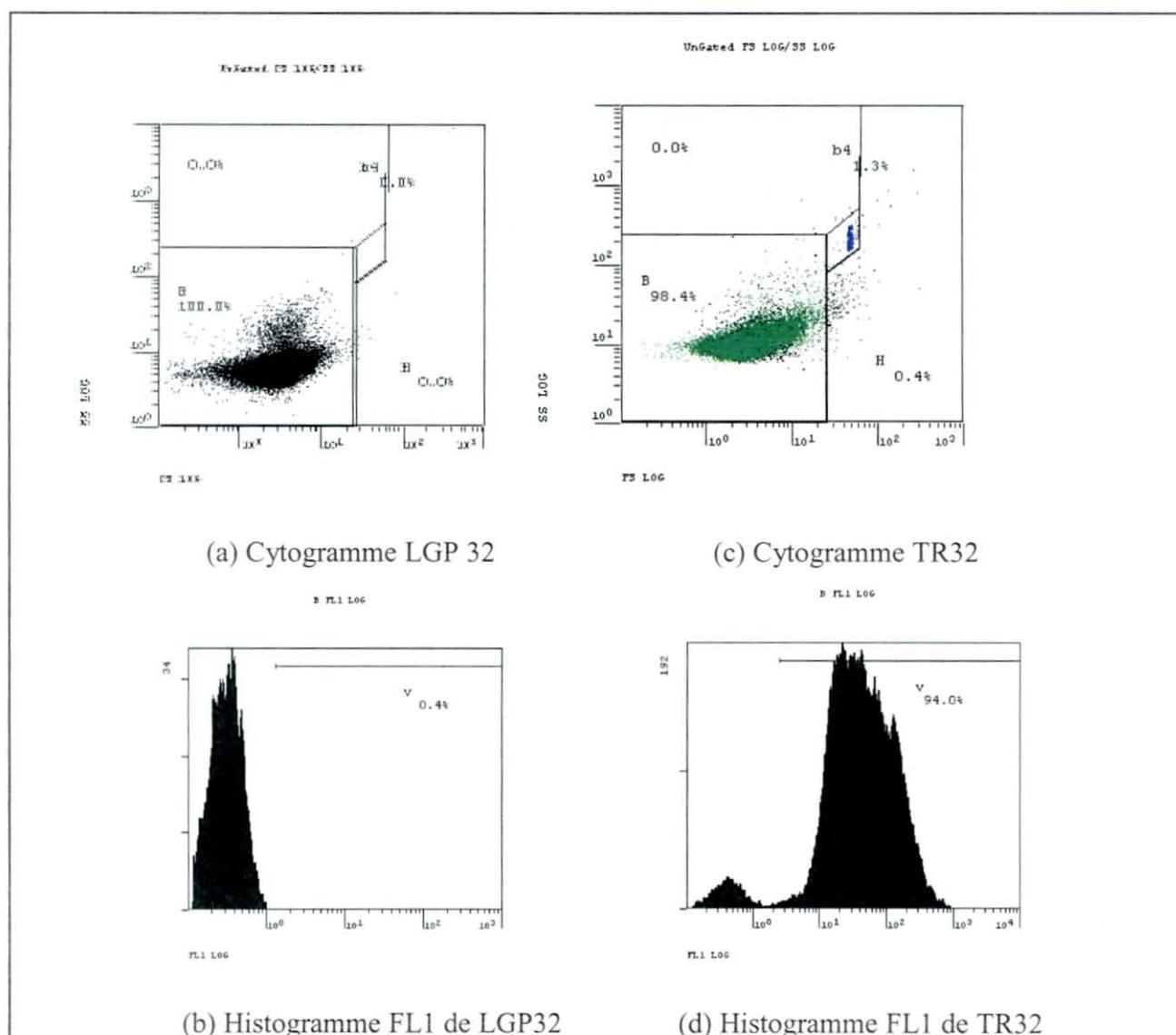


Figure 3 : Cytogramme et histogramme de détection de la souche TR32 en FL1

4. Résultats

4.1. Mise au point de méthodologies

4.1.1. Détection et de quantification des bactéries par cytométrie de flux

Détection des bactéries par cytométrie de flux :

Les paramètres de cytométrie permettant la détection spécifique des souches bactériennes fluorescentes ou non ont été établis en déterminant les seuils de détection pour la fluorescence dans le vert (FL1) la taille (FS) et la complexité (SS) des événements analysés par l'appareil : FL1=900 ; FS=1 ; SS=475. Ce paramétrage permet la détection d'une suspension bactérienne pure de *Vibrio splendidus* ou de *Vibrio aestuarianus*.

Les résultats obtenus (Figure 2) montrent que les bactéries sont détectables avec plus de 99% des événements analysés définis par une petite taille et faible complexité (cercle en rouge). Le 1% restant correspond soit à des débris contenus dans l'échantillon ou la tubulure de l'appareil soit à du bruit de fond électronique inhérent à l'appareil par comparaison avec de l'eau de mer artificielle centrifugée et filtrée (EMA CF).

De même les souches fluorescentes exprimant la GFP (TR32) sont détectées spécifiquement par comparaison des profils de cytométrie entre la souche sauvage LGP32 et la souche mutée TR32 en utilisant une sensibilité de détection dans le vert (FL1) égale à 900 (Figure 3). En effet l'analyse par histogramme de la distribution des événements en fonction de l'intensité de fluorescence révèle qu'une auto fluorescence de seulement 0,4% est détectée chez la souche sauvage (LGP32). En ce qui concerne la souche mutée 94% de la population fluoresce, les 6% restant correspondant soit à des bactéries n'exprimant pas la GFP (bactéries mortes) ou trop faiblement la GFP soit à des contaminants (débris et bruit de fond électronique de l'appareil).

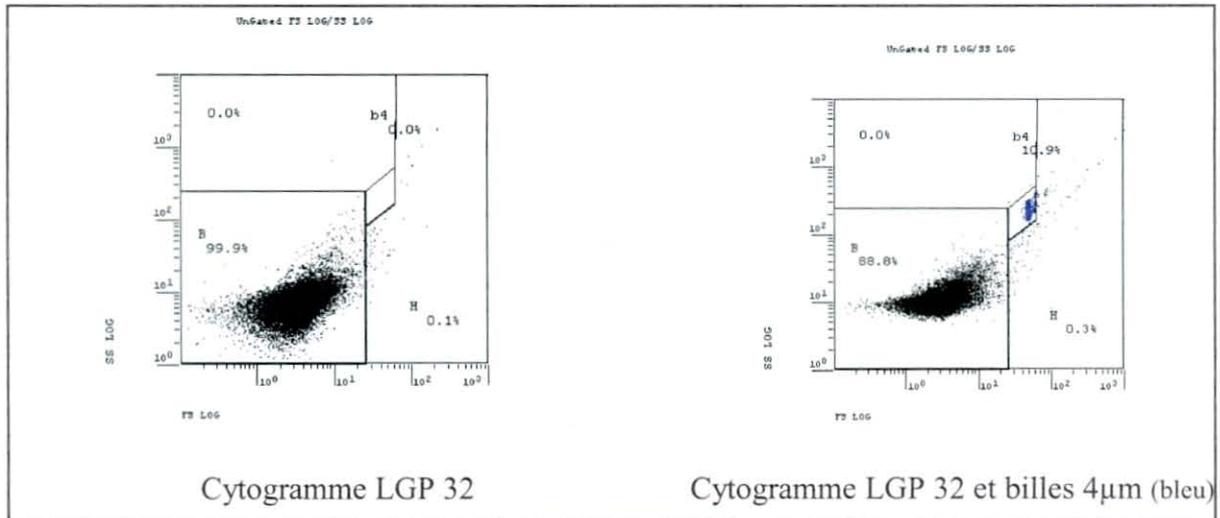
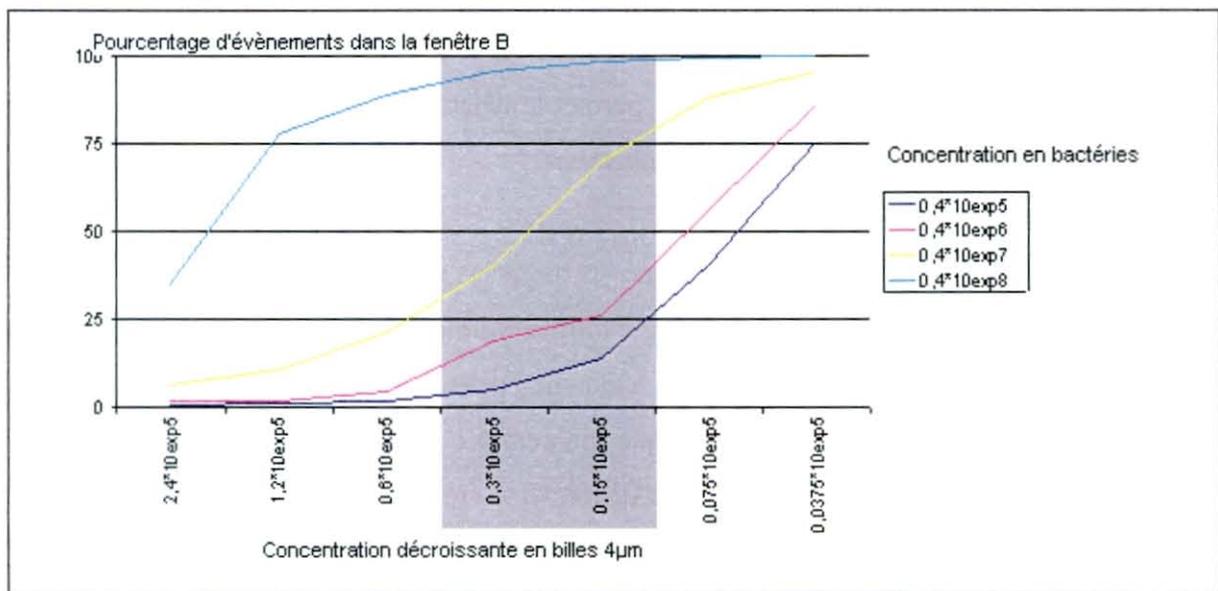


Figure 4 : Détection de LGP 32 avec des billes de 4µm



Graphique 1 : Abaque permettant la quantification des bactéries grâce à l'utilisation de billes de 4µm

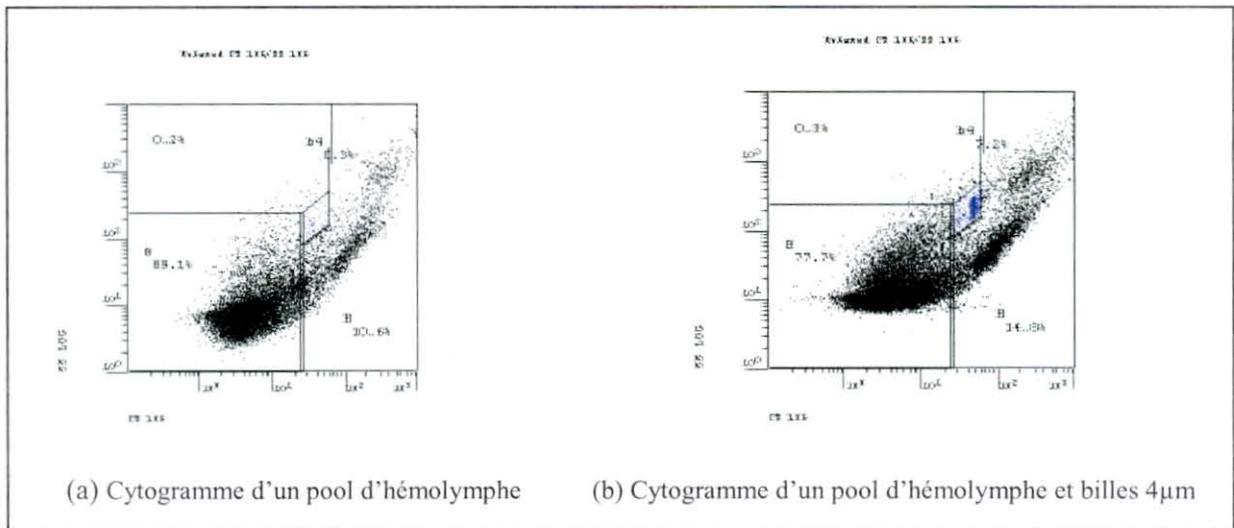


Figure 5 : Détection de l'hémolymphe par cytométrie de flux - utilisation des billes 4µm

Quantification des bactéries :

Le cytomètre utilisé n'est pas conçu pour permettre une quantification des cellules dans un échantillon donné. C'est pourquoi des billes inertes de concentration connue ont été utilisées afin de permettre une quantification relative. Après testage de billes d'un diamètre variable celles de 4µm ont donné les résultats les plus probants (Figure 4). En effet elles apparaissent dans la fenêtre H et sont clairement distinctes des bactéries LGP32 également présentes dans l'échantillon. Une fenêtre « b4 » a ainsi pu être définie. Plusieurs gammes de concentration en billes de 4 µm et en LGP32 ont été utilisés et sont présentées dans l'annexe 6.

L'analyse des cytogrammes obtenus montre que la concentration bactérienne est reliée à la quantité de billes ajoutée dans l'échantillon (Graphique 1). Ces abaques permettent d'estimer la concentration d'une suspension bactérienne à 1 log près dans un échantillon dont la concentration en billes est connue.

Des concentrations finales en billes de $0,15 \cdot 10^5$ à $0,3 \cdot 10^3$ /mL permettent d'obtenir les résultats de quantification bactérienne les plus discriminants. La sensibilité de cette méthode de quantification relative des bactéries est d'environ 40.000 UFC/ml. Elle permet en outre de détecter avec une précision d'un logarithme une gamme de concentration en suspension bactérienne comprise entre $4 \cdot 10^4$ et $4 \cdot 10^7$ UFC/ml.

4.1.2. Analyse de l'hémolymphe de l'huître

Afin de permettre l'étude des interactions hémocytes-vibrions par cytométrie de flux, les hémolymphe d'huîtres saines ont été analysées (figure 5). Après réalisation d'un pool d'hémolymphe les billes de 4µm sont ajoutées à l'échantillon. Les billes de 4µm représentent 7,3 % des évènements de cet échantillon. Par comparaison au même échantillon sans ajout de billes, on note que celles-ci n'interfèrent pas dans l'analyse des évènements correspondant aux cellules hémocytaires (fenêtre H) définies par une taille supérieure à 25 (valeur se FS). C'est également pour cette raison que cette taille de bille a été sélectionnée après testage d'une gamme de billes d'un diamètre différent. Deux populations hémocytaires représentant 14% des évènements analysés apparaissent sur ce cytogramme. L'une est constituée de cellules de taille petite à moyenne et de complexité faible à moyenne par opposition à la seconde de plus grande taille et plus complexe. Ces deux populations correspondent probablement à des cellules agranuleuses et granuleuses respectivement, comme illustré plus loin.

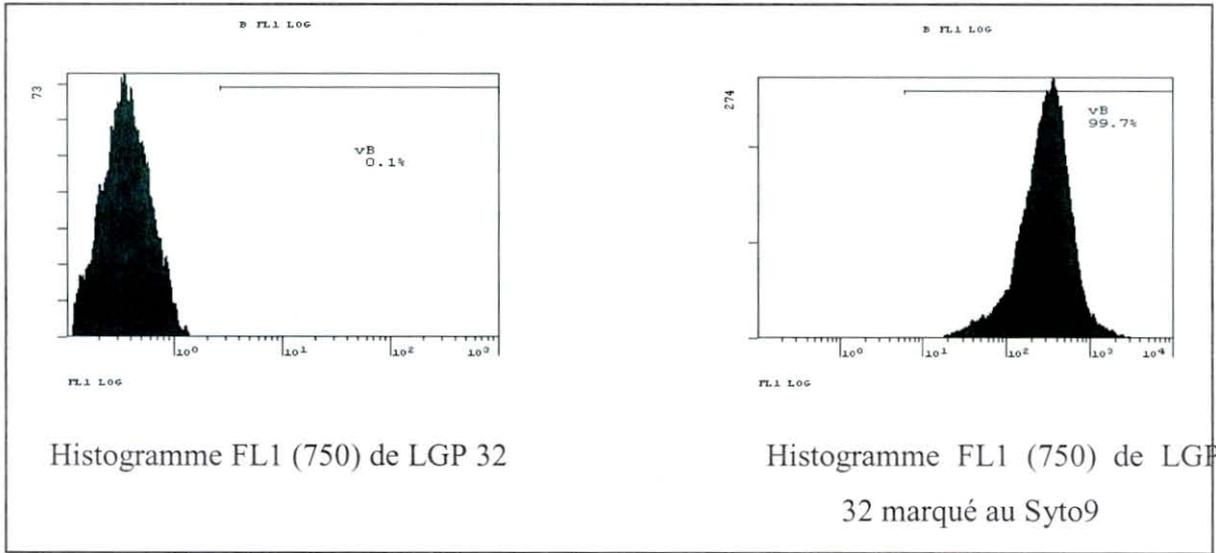


Figure 6 : Comparaison en FL1 (750) de la souche LGP 32 traitée ou non au Syto9

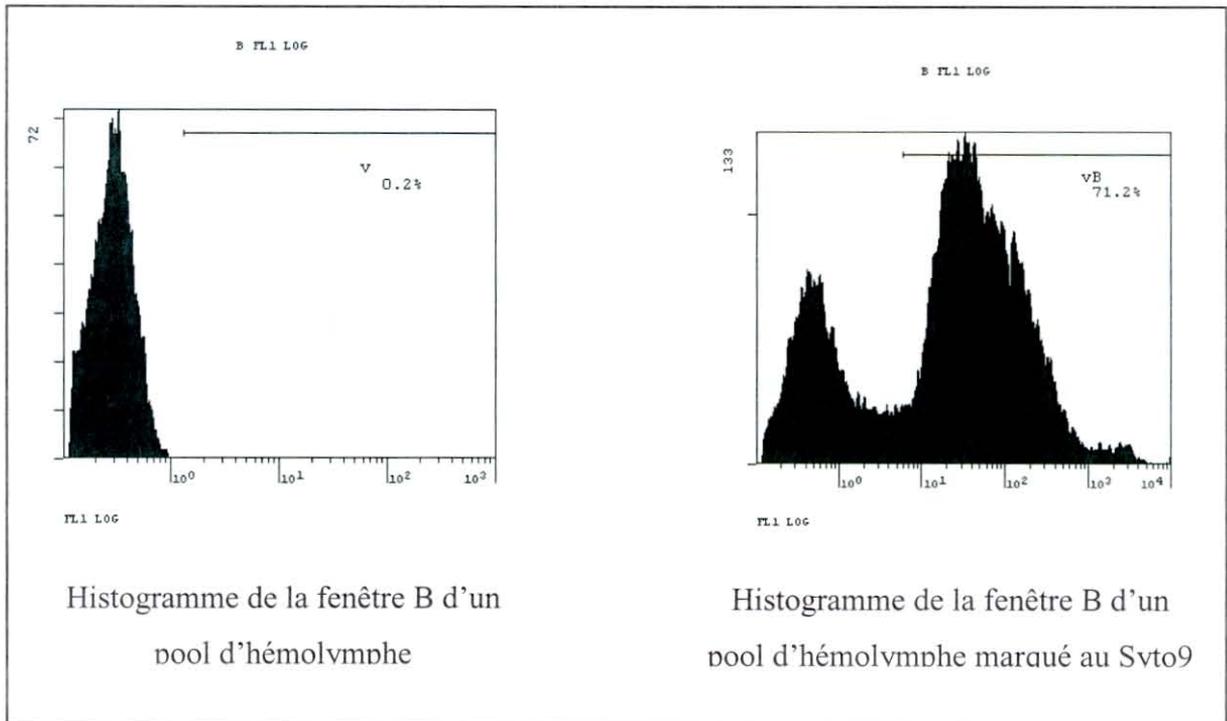


Figure 7 : Comparaison en FL1 (750) des événements comptabilisés en « B » d'un pool d'hémolymph traité ou non au Syto9

La fenêtre B totalise 77,7% des évènements. Ceux ci correspondent aux bactéries de la flore normale de l'huître mais peuvent également être constitués d'autres cellules contaminant l'échantillon (gamètes males notamment en période de maturation sexuelle de part la proximité du muscle adducteur – lieu de ponction de l'hémolymphe – et de la gonade) et débris cellulaires (cellules lysées ou produits de dégranulation), comme illustré plus loin.

Afin d'être en mesure de caractériser la viabilité des hémocytes et des bactéries et de reconnaître spécifiquement les cellules des débris divers fluorochromes ont été utilisés.

4.1.3. Evaluation de marqueurs nucléiques

Le Syto 9 :

Le Syto 9 est un composé du SybrGreen, un intercalant de l'ADN fluorescent en vert lorsqu'il est fixé aux acides nucléiques et qu'il est excité par le laser à une longueur d'onde de 488nm. Son utilisation a nécessité de définir le niveau de sensibilité de l'appareil permettant une détection optimale de ce fluorochrome. Une comparaison des profils de détection de la fluorescence sur la souche LGP32 marquée ou non au Syto9 en faisant varier les niveaux de sensibilité de l'appareil a permis d'établir qu'une sensibilité de 750 était optimale pour permettre une détection spécifique des bactéries marquées. Ainsi une suspension bactérienne de LGP32 non marqué au Syto 9 présente 0,1 % d'autofluorescence (Figure 6). La même suspension traitée au Syto9 est marquée à 99,7% avec une intensité de fluorescence cent fois plus élevée.

Un pool d'hémolymphe a été marqué au Syto9 afin de déterminer la nature des évènements rencontrés dans la fenêtre B précédemment illustrée. L'analyse des histogrammes révèle que 71,2% des évènements comptabilisés correspondent à des cellules de la taille des vibrions (Figure 7). Les 28,2 % restant correspondent à des débris ou à des produits issus de la dégranulation des hémocytes et ne présentant pas d'ADN.

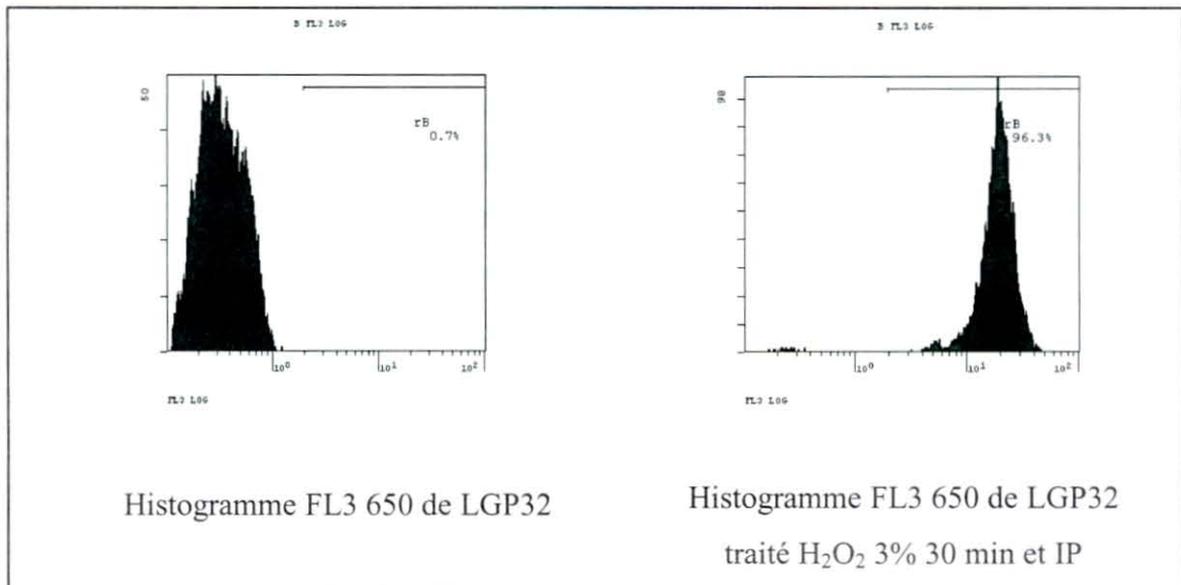


Figure 8 : Comparaison en FL3 (650) de la souche LGP 32 marquée à l'IP préalablement traitée ou non à l'eau oxygénée

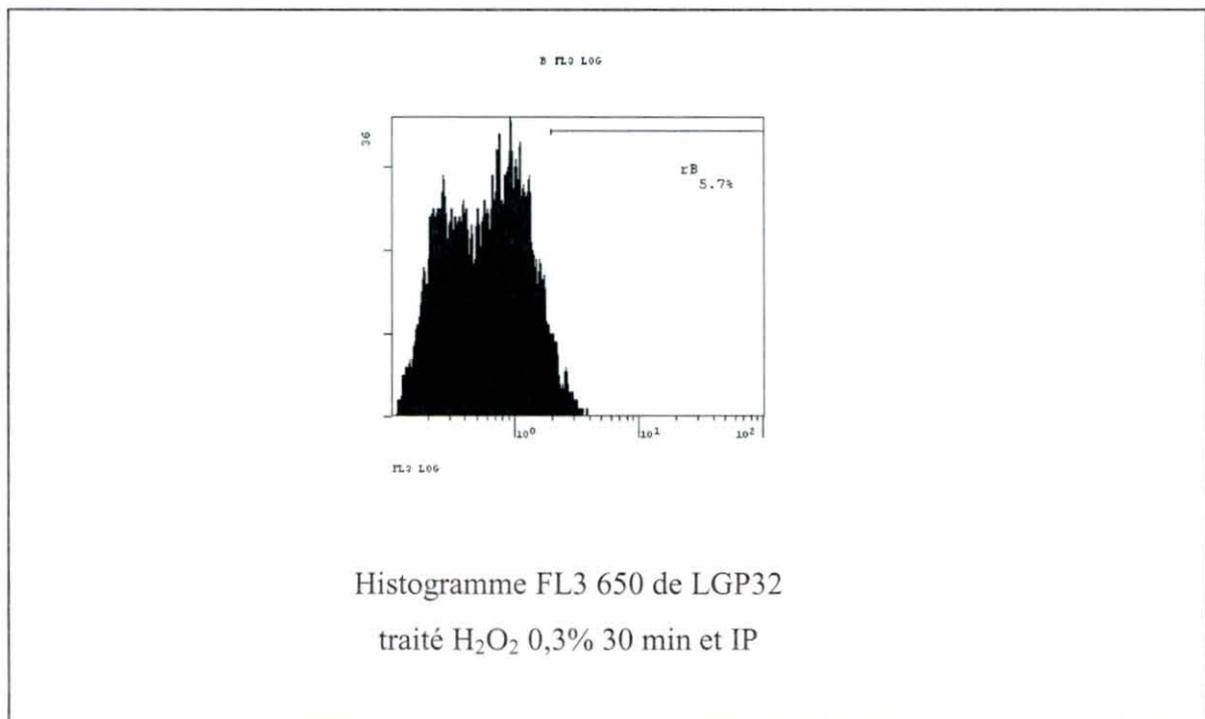


Figure 9 : Marquage à l'IP d'une suspension de LGP32 traité avec 0,3% d'eau oxygéné

L'iodure de propidium :

L'iodure de propidium (IP) est un intercalant de l'ADN qui fluoresce en rouge lorsqu'il est fixé aux acides nucléiques et excité par la lumière monochromatique du laser. Il permet de marquer les cellules mortes car il ne peut entrer dans les cellules que si celles-ci présentent des lésions membranaires. Des essais de détection des bactéries mortes ont été entrepris. Son utilisation a nécessité de définir le niveau de sensibilité de l'appareil permettant une détection optimale de ce fluorochrome (canal FL3).

Une suspension bactérienne de LGP32 a été traitée avec de l'eau oxygénée à 3% final. Une comparaison des profils de détection de la fluorescence sur une suspension bactérienne de LGP32 traitée ou non à l'eau oxygénée pendant 30 minutes puis marquée à l'IP en faisant varier les niveaux de sensibilité de l'appareil a permis d'établir qu'une sensibilité de 650 était optimale pour permettre une détection spécifique des bactéries mortes. Les bactéries vivantes présentent une autofluorescence de seulement 0,7% alors que 97,4% de la population de bactéries traitée à l' H_2O_2 fluorescence (Figure 8). Un étalement de cet échantillon utilisé pur sur une boîte de Pétri coulée en Zobell a permis de confirmer que ces bactéries étaient bien mortes.

Un traitement à l'eau oxygénée à 0,3% final pendant 30 minutes de la suspension bactérienne LGP32 tue également les bactéries puisque aucune colonie n'est observable après étalement sur boîte de Pétri coulée en Zobell. Par contre ce traitement semble insuffisant pour permettre le passage de l'IP dans le cytosol de la bactérie puisque seuls 5,7% des bactéries fluorescent en rouge (Figure 9). Ce fluorochrome n'est donc pas un marqueur spécifique de mortalité bactérienne au moins en ce qui concerne la souche LGP32.

4.1.4. Effet d'un protocole « de dépuración » des huîtres

Du fait de la présence d'une flore bactérienne normale dans l'hémolymphe des huîtres creuses, très fluctuante quantitativement et qualitativement sous l'influence des paramètres environnementaux et de la saison notamment (Maeda et al. 2003; Thompson et al. 2004b), il semblait important de disposer tout au long de ce stage d'animaux présentant des niveaux comparables de portage bactérien afin d'obtenir une flore bactérienne normale présente dans l'hémolymphe « normalisée ». En effet il est probable que cette flore bactérienne influence les interactions hôte - vibrion que l'on souhaitait caractériser ne serait ce que par leur pouvoir probiotique ou à l'opposé pathogène supposé.

Analyse de la qualité de l'eau d'élevage des installations du LGP :

L'analyse bactériologique des prélèvements d'eau d'alimentation des bacs réalisés en février montre des résultats très satisfaisants avec en moyenne moins de 200 UFC/ml. Par contre en mai des valeurs plus élevées de $1,2 \cdot 10^3$ UFC/mL ont été observées.

Effet sur la charge microbienne de l'huître :

Cette analyse (Annexe 7) a été effectuée sur des huîtres sauvages prélevées dans l'estuaire de la Seudre sur deux sites différents. Quelque soit l'origine des animaux les 11 individus analysés le 28 février (température de l'eau d'environ 12°C) une flore bactérienne quantitativement faible, comprises entre $8,5 \cdot 10^3$ UFC/ml (1 animal) et moins de 200 UFC/ml (7 animaux) a été dénombrée. Onze autres individus de même origine ont été mis en stabulation pendant 7 jours dans les bacs d'élevage du LGP. Ils présentaient tous une flore bactérienne réduite au niveau de leur hémolymphe, avec moins de 200 UFC/mL ce qui correspond à la limite de sensibilité de la technique de dénombrement sur boîte, compte tenu de la dilution utilisée.

Une analyse comparable (mêmes sites de prélèvement) a été réalisée le 16 mai. Huit animaux présentaient une charge bactérienne comprise entre $8 \cdot 10^2$ UFC/ml et $4,2 \cdot 10^4$ UFC/mL. La flore bactérienne de 8 autres huîtres placées en stabulation pendant 6 jours dans les bacs du LGP était significativement plus basse avec des valeurs entre $1 \cdot 10^2$ UFC/mL et $3 \cdot 10^3$ UFC/mL. Cependant la mise en évidence dans l'eau d'alimentation des bacs d'une flore bactérienne significative de $1,2 \cdot 10^3$ UFC/mL illustre le fait que le traitement de filtration n'est pas optimale au regard de sa qualité bactériologique. Il est notable également que la charge bactérienne de l'hémolymphe des huîtres reflète étroitement celle présente dans l'eau.

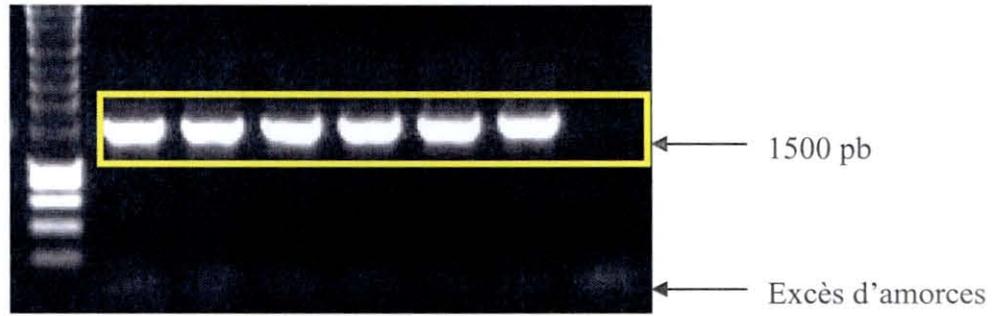


Photo 1 : *rpoD* de 6 souches de *V.coralliiticyus* amplifié par PCR

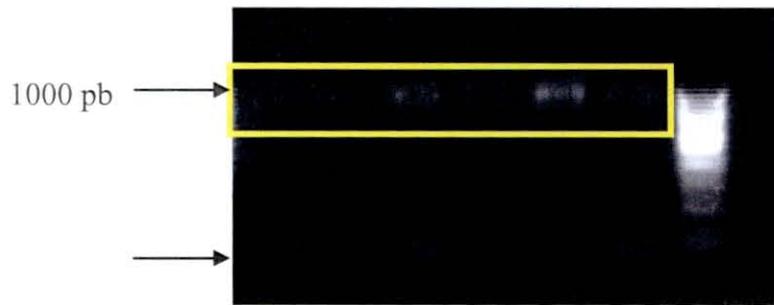


Photo 2 : *rpoD* de 6 souches *V.coralliiticyus* amplifié par PCR

4.1.5. Essais de détection de trois espèces de Vibrions (en biologie moléculaire) :

Séquençage de gènes d'intérêt phylogénétique chez *V. coralliitycus* :

Le gène codant l'ARN 16S des 5 souches étudiées a été amplifié avec succès par PCR à l'aide d'amorces universelles (Photo 1) donnant un seul amplicon de taille attendue et en quantité suffisante. Après purification et séquençage une séquence exploitable de 676 nucléotides a été obtenue pour chacune des souches. Le polymorphisme de séquence inter souche est de 0,15% : 1 seul nucléotide de différence sur un même site pour deux des 5 séquences analysées. Une recherche d'homologie de séquences dans les bases de données en utilisant le programme Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) révèle que ces bactéries appartiennent bien à l'espèce *coralliitycus*. En effet plus de 98% d'identité de séquence sont obtenus avec la souche LMG 21349 déposée dans Genbank sous le n° d'accèsion AJ440004 en prenant en considération le fait que la séquence de cette dernière souche comporte de nombreuses imprécisions (nucléotides indéterminés).

Des amplicons correspondant au gène *rpoD* ont été également obtenus par PCR chez les 5 souches *V. coralliitycus*. Un seul amplicon de taille attendue est visible sur gel pour chaque souche étudiée, l'intensité d'amplification est néanmoins plus faible que celle obtenue sur le gène *ARN 16S* (Photo 2). Par voie de conséquence une seule séquence exploitable et de longueur suffisante a été obtenue. Aucune homologie de séquence significative n'a été obtenue au niveau nucléotidique contrairement à la séquence en acides aminés déduite de la première, d'une taille de 201 acides aminés. En effet on observe 77% d'identité de cette séquence avec le gène *rpoD* d'une souche appartenant à *V. alginolyticus*, dont le n° d'accèsion est ZP 01261628

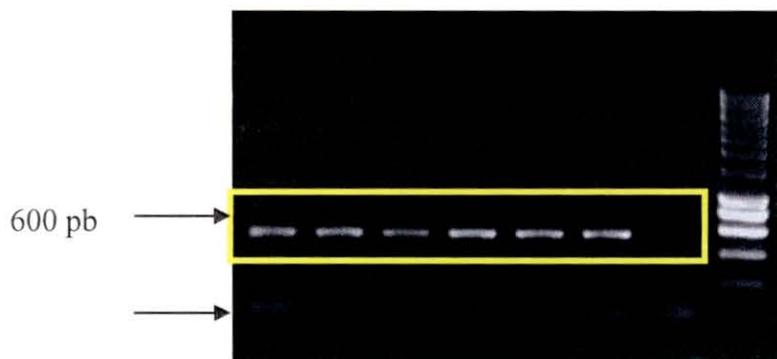


Photo 3 : *toxR* de 6 souches *V.coralliitycus* amplifié par PCR

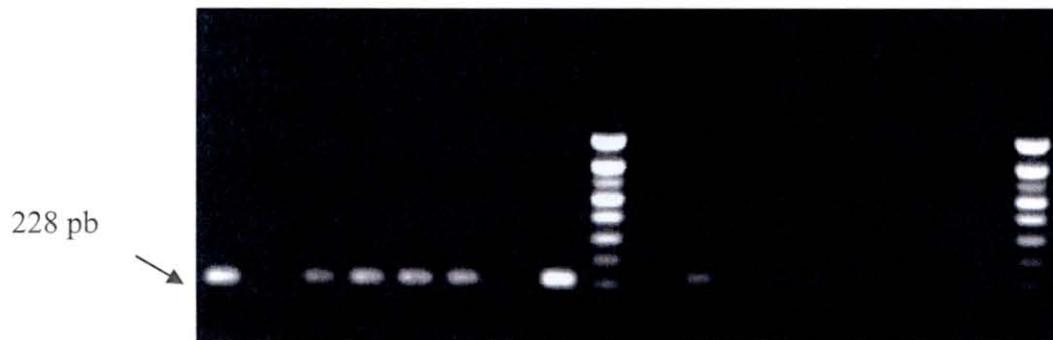


Photo 4 : Produits d'amplification par PCR de différentes espèces de vibrions avec des amorces ciblant le gène *ARN 16S* de *V. splendidus*

Le gène *toxR* a été identifié par PCR chez les 5 souches *V. coralliitycus*. Un seul amplicon de taille attendu a été obtenu pour chacune des souches (Photo 3). Ces fragments d'ADN ont ensuite été purifiés et séquencés. Quatre séquences exploitables de 492 nucléotides ont été obtenues puis alignées entre elles. Le polymorphisme de séquence entre ces espèces est de 3,25% maximum. Aucune homologie de séquence nucléotidique n'est trouvée dans les banques de données. On confirme cependant qu'il s'agit bien d'une séquence *toxR* après traduction, avec plus de 60% d'identité de la séquence aminoacide avec une souche *Vibrio alginolyticus* n° AF170882.

Détection par PCR classique d'espèces de vibrions pathogènes de l'huître creuse :

Un total de 42 souches bactériennes appartenant à 26 espèces bactériennes différentes et comprenant 25 souches type ont été cultivées à partir de la bactériothèque du LGP <http://www.ifremer.fr/crb/> (Annexe 1). Toutes ces souches ont été extraites selon le protocole Whatman après élution de l'ADN des confettis.

Plusieurs couples d'amorces pour chacun des gènes cibles ont été évaluées par PCR en utilisant les 42 extraits d'ADN. Pour chaque gène un couple d'amorces a ensuite été sélectionné donnant les meilleurs résultats en terme de spécificité et d'efficacité d'amplification après avoir testé une gamme de température d'hybridation aux alentours de 60°C (58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C et 63° C).

La photo 4 représente une partie des produits PCR analysés à partir des extraits dilués au 1/10 réalisés sur les 26 souches spécifiques d'espèce une fois les optimisations de la PCR réalisées (choix d'amorces, température d'hybridation). Seules les souches apparentées à l'espèce *V. splendidus* donnent un amplicon de forte intensité et de taille attendue, de 228 pb. Il s'agit notamment des espèces *splendidus* (piste 1), *lentus* (3), *tasmaniensis* (4), *pomeroyi* (5), *kanaloae* (6), *crassostreae* (8), *cyclitrophicus* (10), *gigantis* (non visible sur cette partie du gel). L'espèce la plus proche de *V. splendidus* d'un point de vue phylogénétique, *V. chagasii* (2 et 7) n'est pas détectée (deux souches) ainsi que les autres espèces testées (Annexe 1).

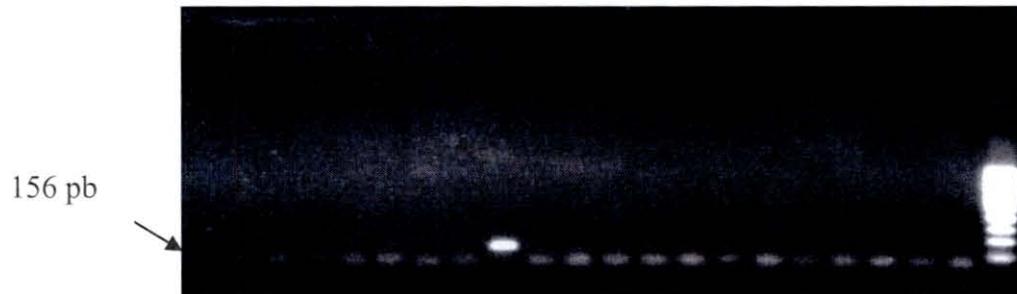


Photo 5 : Produits d'amplification par PCR de différentes espèces de vibrions avec des amorces ciblant le gène *gyrB* de *V. aestuarianus*



Photo 6 : Produits d'amplification par PCR de différentes espèces de vibrions avec des amorces ciblant le gène *toxR* de *V. coralliitycus*

Des amplicons de la taille attendue peuvent parfois être observés à partir des souches non apparentées à *V. splendidus*, quoique de façon très discrète (non visibles sur la photo 4 présentée). Nous verrons plus loin dans la partie PCR quantitative que ces signaux très faibles correspondent à des faux positifs. Ce bruit de fond n'a pas pu être supprimé en augmentant la température d'hybridation jusqu'à 62°C, sachant qu'à 63°C les conditions de stringence de la PCR sont trop élevées et que plus aucune souche apparentée à *V. splendidus* ne donne un signal PCR.

Les extraits d'ADN des 26 souches spécifiques d'espèce précédentes ont été testés avec un couple d'amorce déduit des alignements de séquence réalisés sur le gène *gyrB*. La photo 5 représente une partie des réactions d'amplification analysées. Seule la souche type *V. aestuarianus* (piste 9) donne un amplicon de taille attendue de 156 pb.

Enfin les mêmes extraits d'ADN que précédemment ont été testés avec un couple d'amorce déduit des alignements de séquence réalisés sur le gène *toxR* comprenant celles obtenues par séquençage à partir des 5 souches *V. coralliitycus*. La photo 6 représente une partie des réactions d'amplification analysées sur gel d'agarose. Les cinq souches *V. coralliitycus* donnent un amplicon de taille attendue cependant seules trois de ces souches sont analysées sur cette partie du gel (pistes 13, 23, 24)

Diagnostic d'espèce par PCR quantitative :

Les ADN de *V. splendidus* souche type 4042T, *V. aestuarianus* souche type 03/008 et de *V. coralliitycus* 06/210 ont été extraits selon un protocole classique au phénol / chloroforme / alcool isoamylique. Ces ADN ont ensuite été quantifiés au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 260 nm et la qualité des ADN extraits évaluée selon le rapport des densités optiques (DO) à 260 nm et 280 nm. Les résultats indiquent que tous les ADN extraits ont des DO de 1,6 à 1,7 ce qui dénote d'une qualité satisfaisante. Des dilutions ont été ensuite effectuées afin d'évaluer sur une gamme de concentration en ADN la faisabilité d'une PCR quantitative en utilisant les amorces dont la spécificité a été évaluée par PCR classique comme illustré précédemment. Les essais d'amplification par PCRq ont été réalisés en utilisant chaque amorce à 200nM finale.

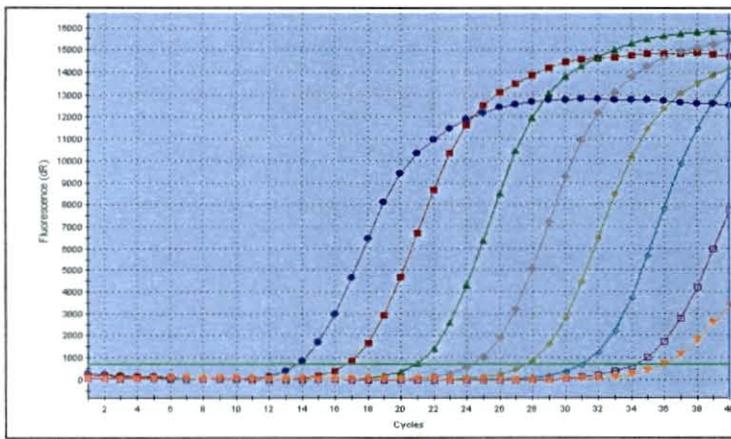
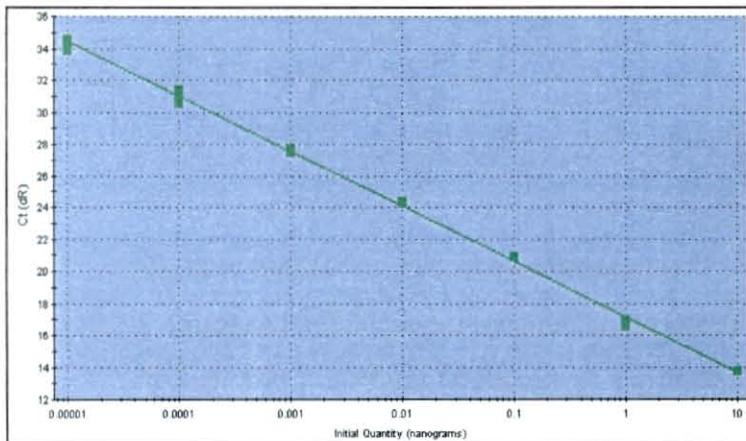
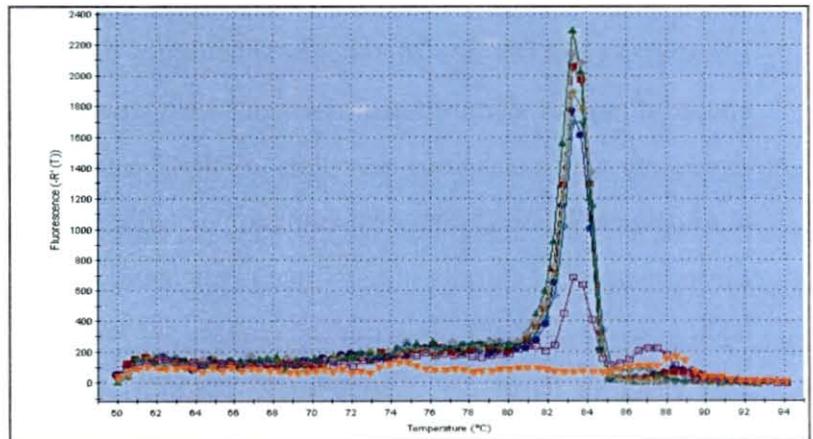


Figure 10 : Courbe d'amplification selon la concentration en ADN matrice de *V. splendidus* avec les amorces ciblant le gène *ARN 16S*. Les concentrations ont été diluées de 10 en 10. La quantité d'ADN matrice avant amplification est comprise entre 10 ng et 1 fg

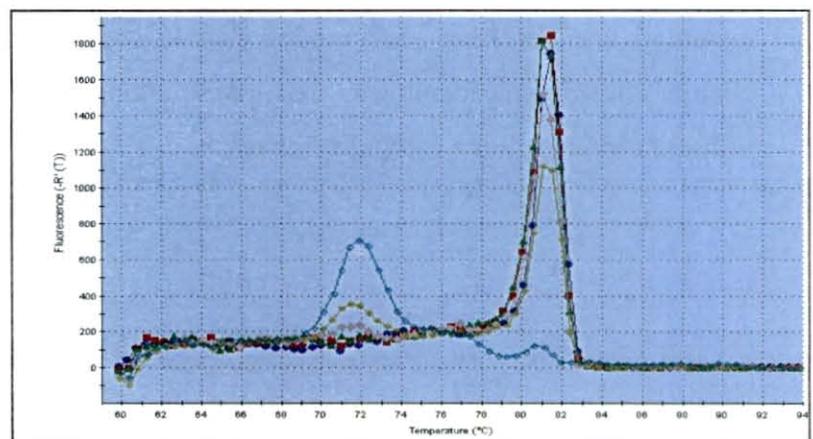
Figure 11 : Courbe de dissociation des amplicons générés avec les amorces ciblant le gène *ARN 16S* de *V. splendidus*



Log fit values
 Spl Standards, RSq:0.998
 Spl, $Y = -3.482 \cdot \text{LOG}(X) + 17.14$, Eff. = 94.5%

Figure 12 : Courbe d'étalonnage des amplicons générés avec les amorces ciblant le gène *ARN 16S* de *V. splendidus* selon la quantité totale en ADN présente avant amplification

Figure 13 : Courbe de dissociation des amplicons générés avec les amorces ciblant le gène *gyrB* de *V. aestuarianus*



Evaluation des différents couples d'amorces :

- Couple d'amorce pour le gène *ARN 16S*

Le couple d'amorce fonctionne correctement (Figure 10). L'analyse de la courbe de dissociation révèle qu'un seul amplicon a été généré par PCRq (Figure 11) dont le T_m est de $83,3^{\circ}\text{C}$. La courbe d'étalonnage (Figure 12) montre que les répliqués (4 puits) sont quasi identiques, parfaitement alignés selon la concentration en ADN matrice utilisée ($R^2=0,998$) et que l'efficacité de la réaction PCR est satisfaisante avec un taux de $94,5\%$.

- Couple d'amorces pour le gène *gyrB*

L'analyse de la courbe de dissociation montre que des produits ont été générés par PCR (Figure 13). On observe un amplicon unique lorsque l'ADN matrice contenu dans le tube est au moins supérieur à 10fg . A 1fg d'ADN de *V. aestuarianus* et dans le témoin (absence d'ADN) ce qui correspond aux courbes de couleur jaune et bleue respectivement, on note la formation de dimères d'amorces. Le T_m de l'amplicon recherché est de $81,1^{\circ}\text{C}$. La courbe d'étalonnage (Figure 14) révèle que les répliqués sont quasi identiques, alignés correctement selon la concentration en ADN matrice utilisée ($R^2=0,983$) et que l'efficacité de la réaction PCR est satisfaisante, $106,4\%$.

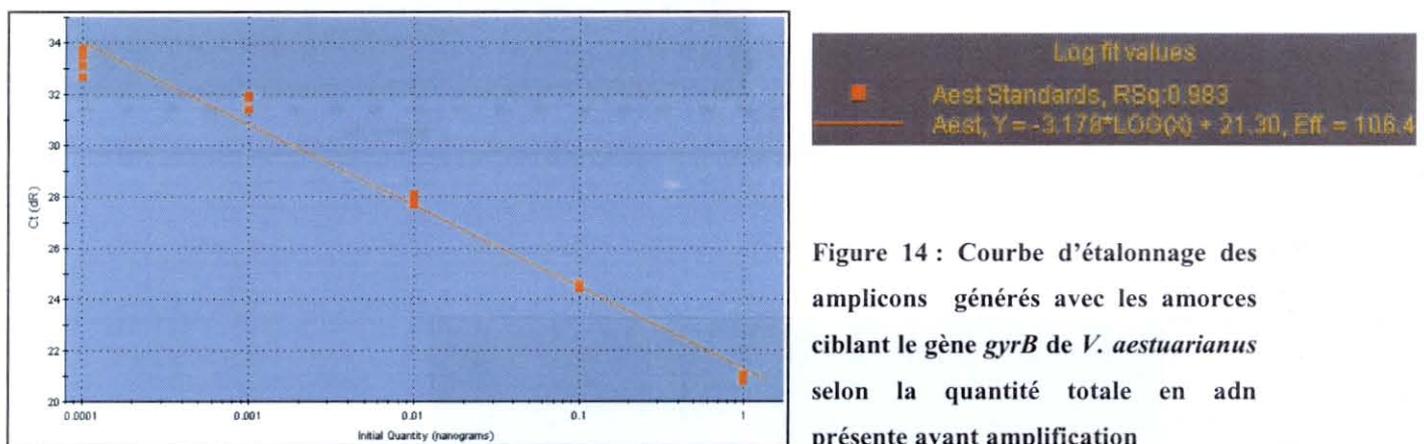


Figure 14 : Courbe d'étalonnage des amplicons générés avec les amorces ciblant le gène *gyrB* de *V. aestuarianus* selon la quantité totale en adn présente avant amplification

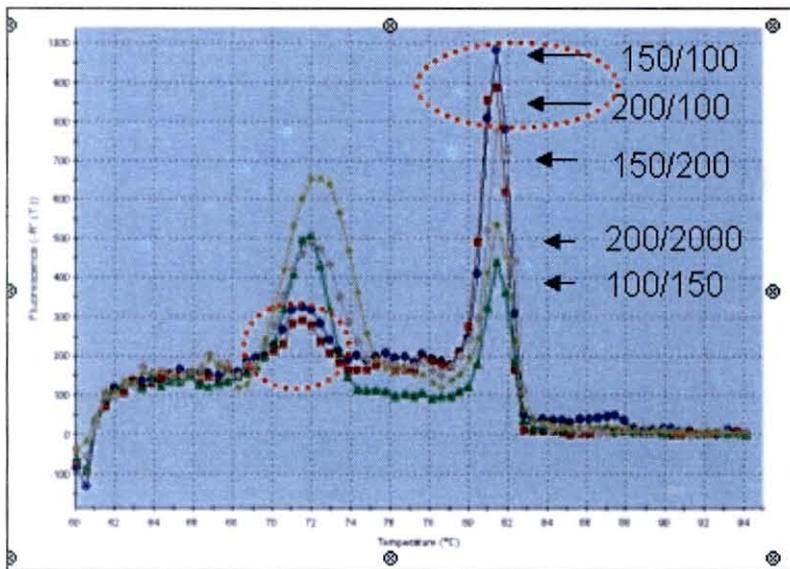


Figure 15 : Amplification par PCRq de 10 fg d'ADN de *V. aestuarianus* et profils de dissociation des amplicons selon la concentration finale de chaque amorce sens/antisens exprimée en nM.

Figure 16 : Amplification par PCRq d'eau afin selon la molarité de chaque amorce afin de minimiser l'apparition des dimères d'amorces.

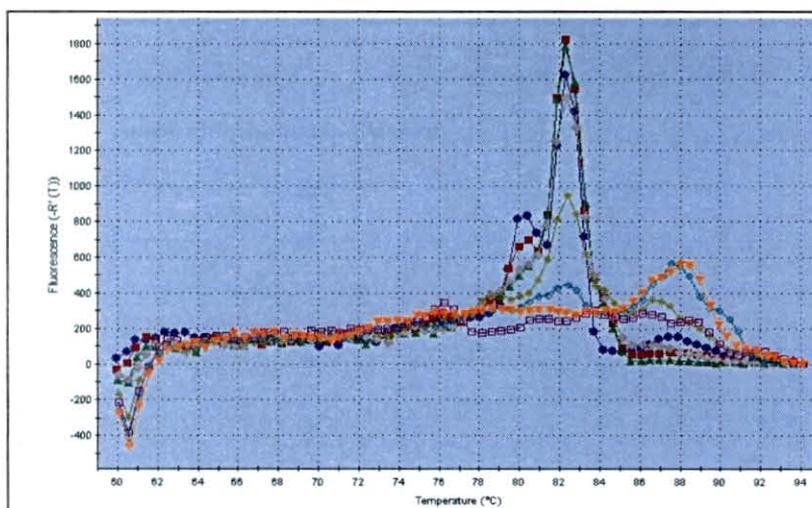
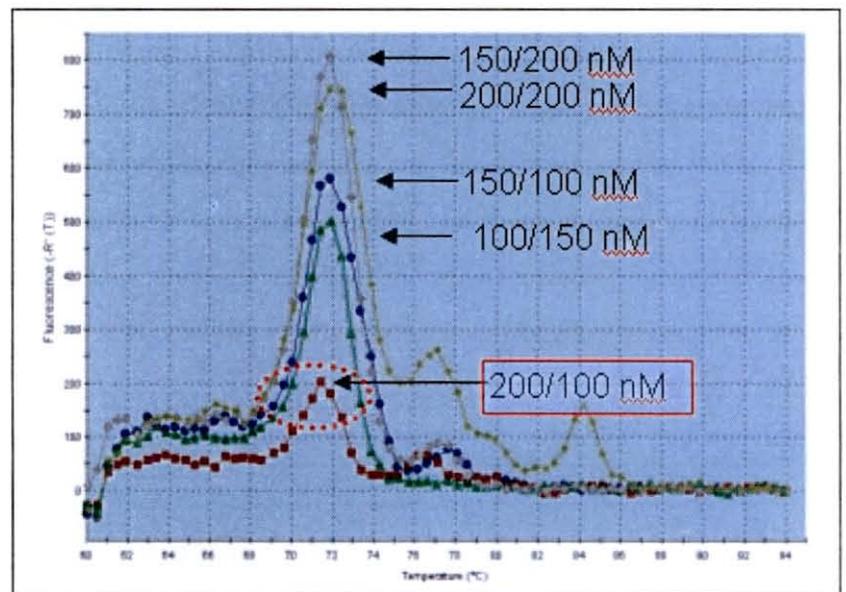


Figure 17 : Courbe de dissociation des amplicons générés avec le 1^{er} couple d'amorces ciblant le gène *toxR* de *V. coralliitycus*

Afin de minimiser la formation de dimères d'amorces pendant la réaction de PCR, différentes combinaisons de concentrations en amorces exprimées en nM ont été évaluées selon le tableau croisé suivant :

		Amorce sens			
		50	100	150	200
amorce antisens	50				
	100				
	150				
	200				

Dix fentogrammes d'ADN de *V. aestuarianus* ont été utilisées afin de permettre la co-amplification de *gyrB* et des dimères d'amorces. Les concentrations en amorces ayant généré les plus grandes quantités en amplicon souhaité sont présentées dans la figure 15 ainsi que les profils de dissociation qui leur sont associés. Les couples d'amorces sens/antisens 150nM/100nM et 200nM/100nM semblent les plus adaptés. Néanmoins après analyse des courbes de dissociation obtenues à partir de l'eau seule (Figure 16), le couple 200nM/100nM est celui qui génère le moins de dimères d'amorces. Par conséquent, ce test a permis de préciser les concentrations optimales en amorces (200nM/100nM) permettant de réduire de façon optimale la formation de dimères d'amorces durant l'amplification de faibles quantités d'ADN matrice.

- Couple d'amorces pour le gène *toxR*

Le même couple d'amorce (F1/R1) que celui utilisé pour la PCR classique a été testé par PCRq en utilisant une gamme de concentration en ADN de la souche *V. coralliitycus*. Les résultats ont été décevants (Figure 17). En effet on observe après analyse de la courbe de dissociation la présence de deux amplicons non spécifiques bordant celui recherché (pic majeur) d'un Tm de 82,3°C. Celui de gauche dont le Tm est de 80,4°C épaulé l'amplicon spécifique et est observé principalement lorsque la quantité d'ADN matrice est élevée (10ng et 1ng total). Celui de droite n'est apparent que dans les témoins sans ADN ou avec la quantité d'ADN la plus faible utilisée d'une valeur de 0,01pg.

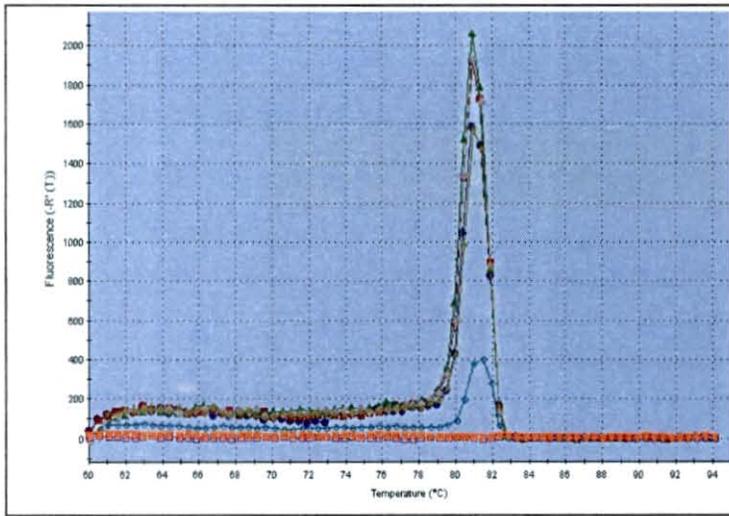


Figure 18 : Courbe de dissociation des amplicons générés avec le 2^{ème} couple d'amorces ciblant le gène *toxR* de *V. coralliiticyus*

cora2 Standards, Rsq: 0.992
 cora2, $Y = -3.686 \cdot \text{LOG}(X) + 22.49$, Eff. = 86.8%

Figure 19 : Courbe d'étalonnage des amplicons générés avec le 2^{ème} couple d'amorces ciblant le gène *toxR* de *V. coralliiticyus* selon la quantité totale en ADN présente avant amplification

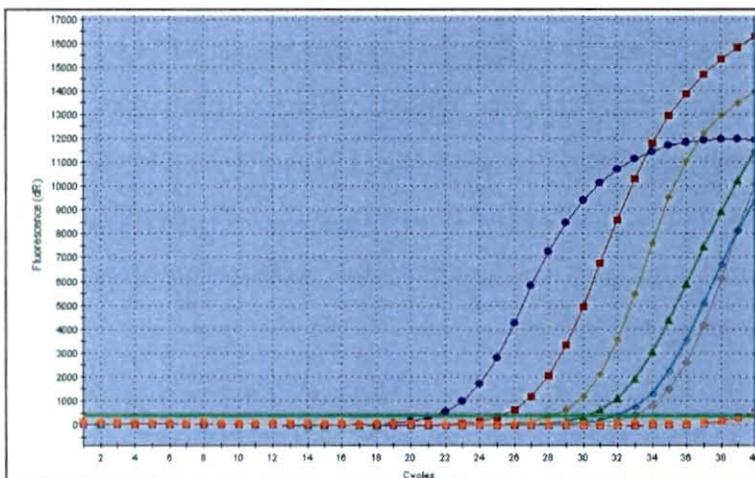
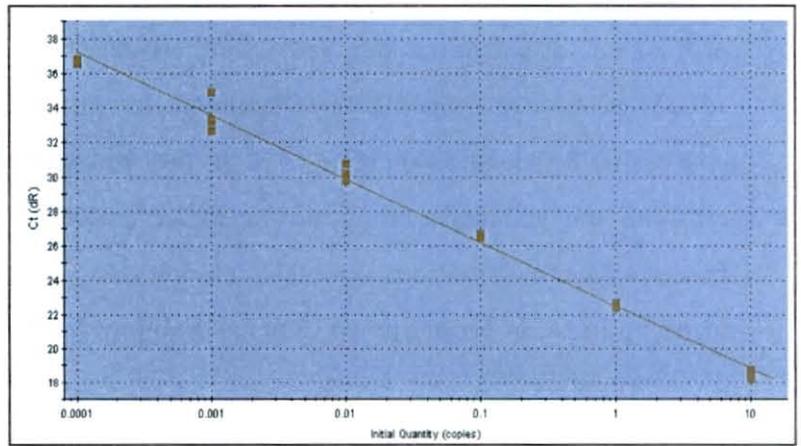


Figure 20 : Courbe d'amplification du test de spécificité des amorces ciblant le gène *ARN 16S* de *V. splendidus*

Par conséquent ce couple d'amorce a

été abandonné en choisissant une nouvelle amorce antisens (R2) tout en conservant l'amorce sens (F1). L'amorce R2 a été déduite des alignements de séquences du gène *toxR* et se trouve 8 nucléotides en amont de l'amorce R1. La réaction de PCR a cette fois ci fonctionnée de façon satisfaisante (Figure 18). En effet un amplicon unique est généré quelque soit la quantité d'ADN matrice utilisée. Le Tm de l'amplicon recherché est de 81,0°C. L'efficacité de la réaction PCR est un peu faible avec une valeur de 86,8 % (Figure 19).

Test de spécificité :

Les ADN de *V. splendidus* souche type 4042T, *V. aestuarianus* souche type 03/008 et de *V. coralliitycus* 06/210 extraits sur papier Whatman, élués puis dilués au 1/10 et 1/100^{ème} dans l'eau ont été utilisés pour tester la spécificité des amorces.

Concernant le couple d'amorces *splendidus*, les premiers échantillons à donner un signal de fluorescence sont les 2 échantillons d'ADN de *V. splendidus* correspondant aux dilutions 1/10 et 1/100 avec un Ct de 22 et 26 respectivement (Figure 20). Un signal qui s'apparente à du bruit de fond est observé pour les ADN de *coralliitycus* et *aestuarianus* à 29 et 31 cycles d'amplification respectivement et pour les concentrations d'ADN les plus élevées (1/10ème). Les amplifications observées sur ces deux souches ne sont pas spécifiques comme le révèle la courbe de dissociation (Figure 21 – flèches rouges et vertes). A quantité égale d'ADN la souche *splendidus* est préférentiellement amplifiée avec un écart d'au moins 7 cycles.

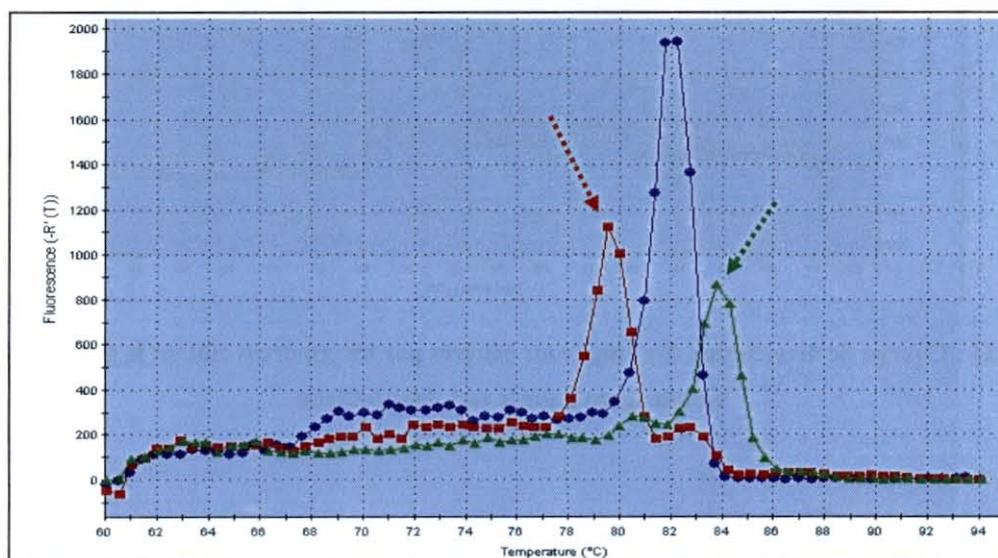


Figure 21 : Courbe de dissociation des amplicons générés par les amorces ciblant le gène *ARN 16S* de *V. splendidus* pour le test de spécificité

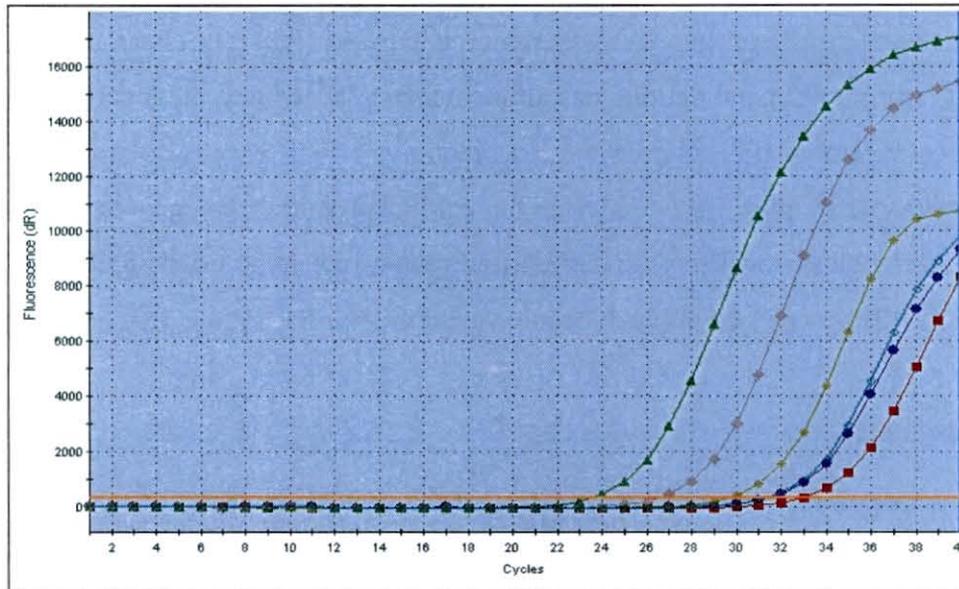


Figure 22 : Courbe d'amplification du test de spécificité des amorces ciblant le gène *gyrB* de *V. aestuarianus*

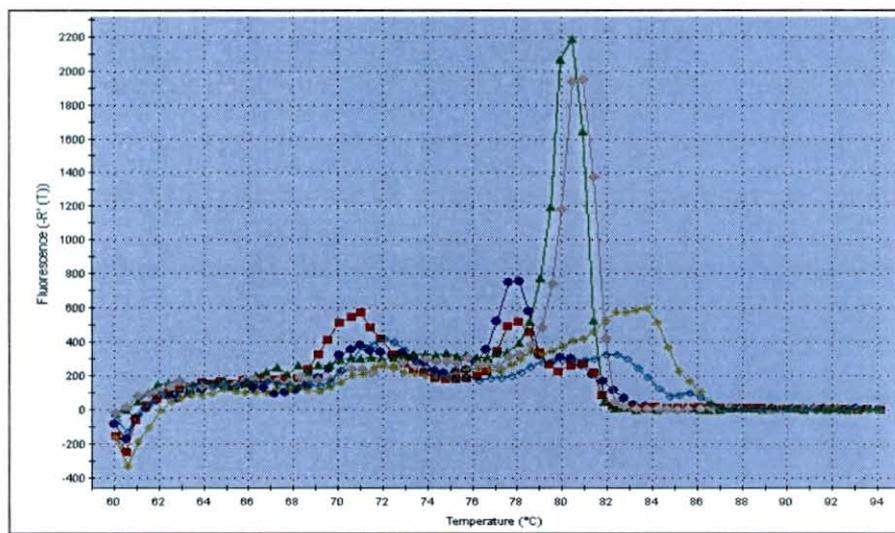


Figure 23 : Courbe de dissociation des amplicons générés par les amorces ciblant le gène *gyrB* de *V. aestuarianus* pour le test de spécificité

Concernant le couple d'amorces *aestuarianus*, les premiers échantillons à donner un signal de fluorescence sont les 2 échantillons d'ADN de *V. aestuarianus* correspondant aux dilutions 1/10 et 1/100 avec un CT de 24 et 27 respectivement (Figure 22). Un signal qui s'apparente à du bruit de fond est observé pour les ADN de *coralliitycus* et *splendidus* à 31 (courbe jaune) et 33 (courbe bleue) cycles d'amplification respectivement et pour les concentrations d'ADN les plus élevées (1/10ème). Les amplifications observées sur ces deux souches ne sont pas spécifiques comme le révèle la courbe de dissociation (Figure 23). A quantité égale d'ADN la souche *aestuarianus* est préférentiellement amplifiée avec un écart d'au moins 7 cycles.

Concernant le couple d'amorces *coralliitycus*, seuls les 2 échantillons d'ADN de *V. coralliitycus* qui correspondent aux dilutions 1/10 et 1/100 génèrent un signal de fluorescence avec un CT de 24 et 28 respectivement (Figure 24).

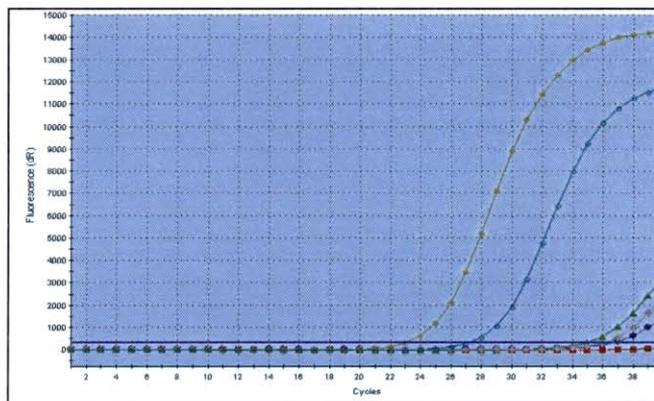


Figure 24 : Courbe d'amplification du test de spécificité des amorces ciblant le gène *toxR* de *V. coralliitycus*

La spécificité de la réaction est confortée par l'analyse de la courbe de dissociation qui présente un pic unique identique à chacune des dilutions en *V. corallitycus* utilisées et de T_m attendu (Figure 25).

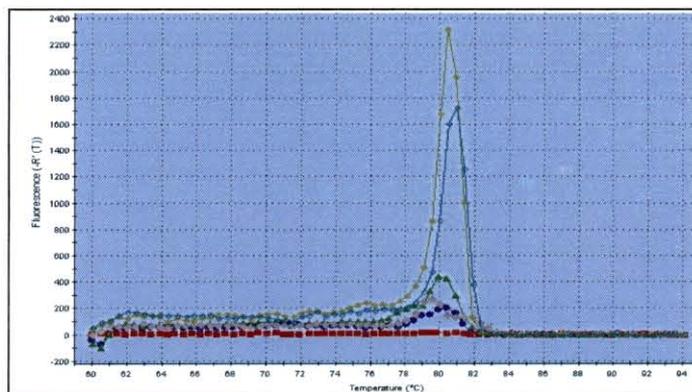
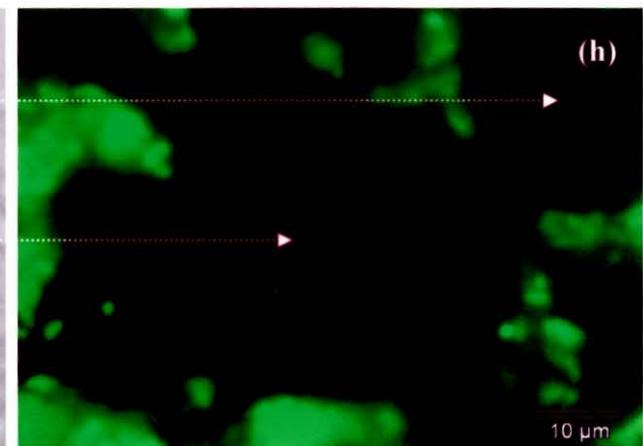
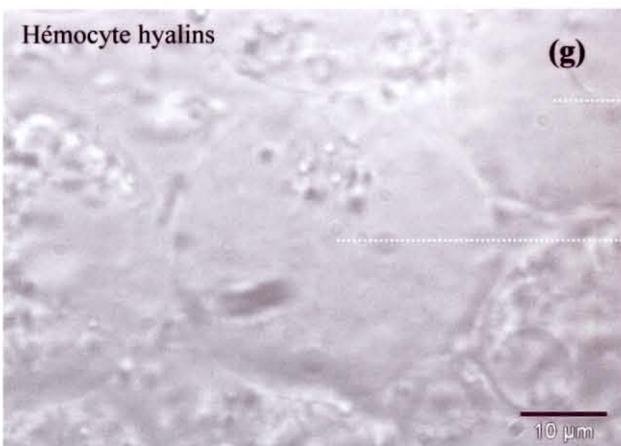
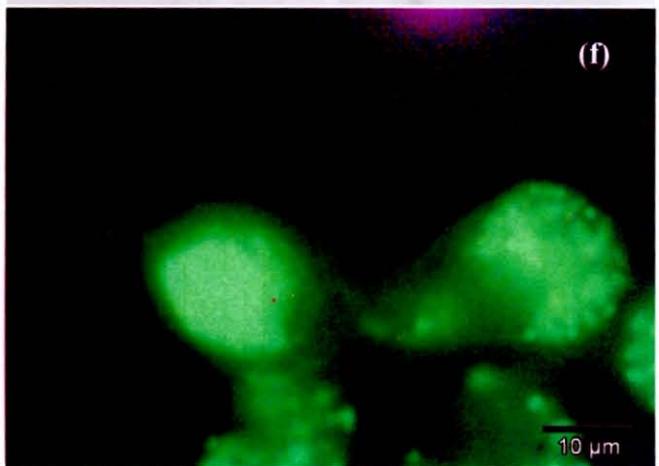
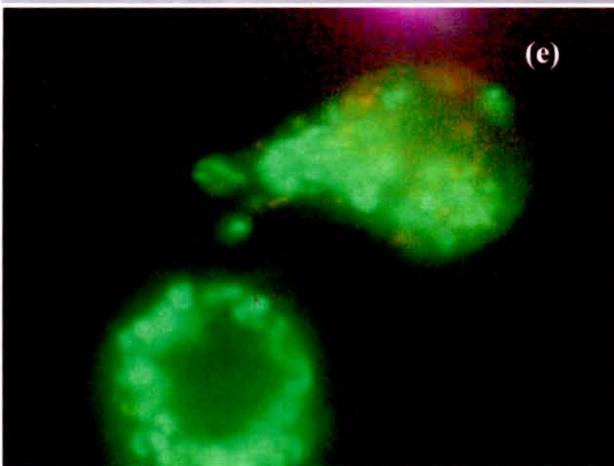
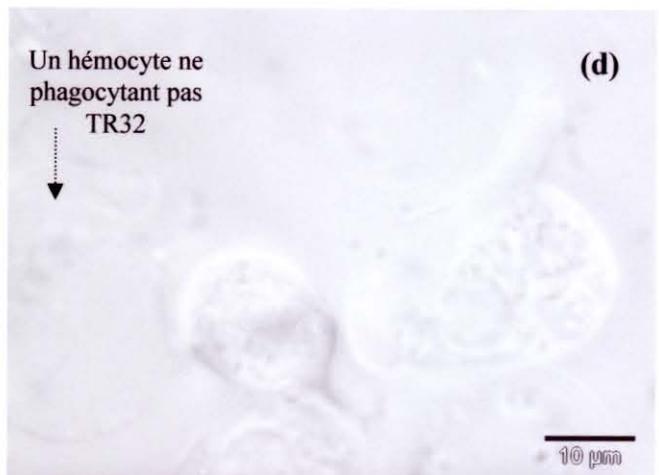
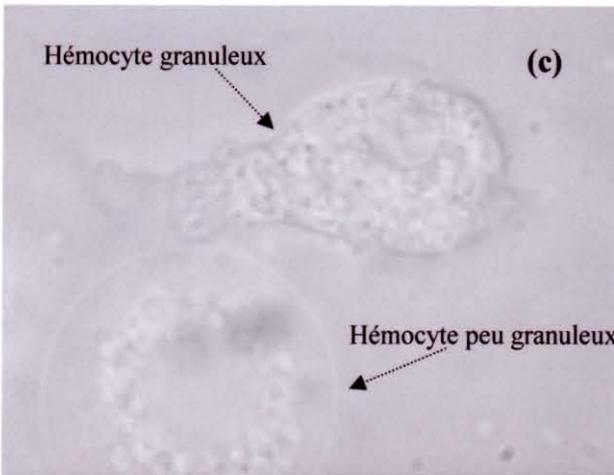
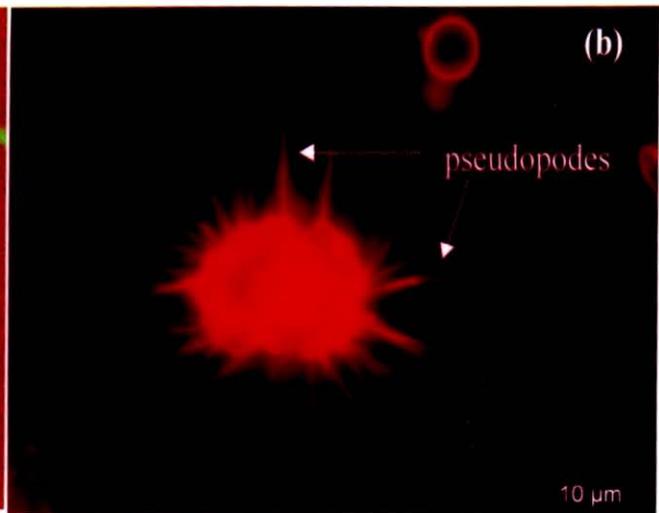
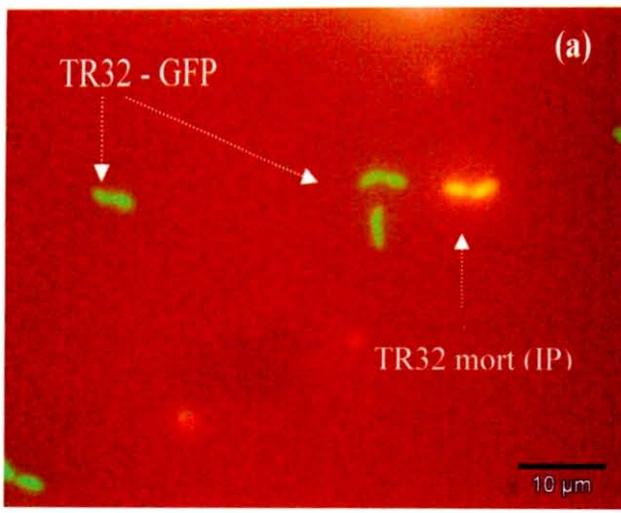


Figure 25 : Courbe de dissociation des amplicons générés par les amorces ciblant le gène *toxR* de *V. coralliitycus* pour le test de spécificité



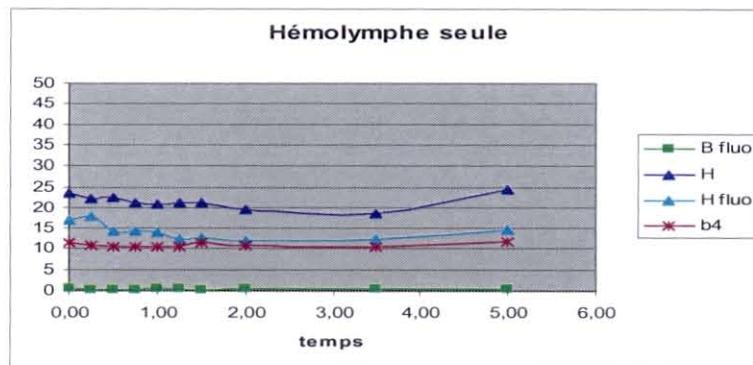
Photos 7 : Observations au microscope à lumière blanche de prélèvements d'hémolymphe c, d, g. Observation au microscope à épifluorescence de vibrions a ou de prélèvements d'hémolymphe b, e, f et h. L'observation de champs identiques correspond au couple c et e, d et f, g et h

4.2. Applications des développements méthodologiques

4.2.1. Etude des interactions hôte - pathogène

Contact hémolymphe - vibrion *in vitro* :

Lors de ce stage nous nous sommes intéressés à l'étude des interactions entre huître et *Vibrio* et plus particulièrement entre les hémocytes et les espèces *splendidus* (souche TR32), virulente, et *tasmaniensis* dénuée de pouvoir pathogène en infection expérimentale (Annexe 8).



Graphique 2 : Evolution des différents composants de l'hémolymphe au cours du temps

Le graphique 2 représente l'évolution de l'hémolymphe seule durant 5 heures d'incubation à température ambiante. La composition de l'hémolymphe est stable tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif (stabilité du % de billes « b4 » et des autres populations « B » et « H » dans l'échantillon). Un marquage de l'hémolymphe à l'IP nous permet d'apprécier la mortalité cellulaire. Seuls 5,4 % des hémocytes présentent une fluorescence rouge (Figure 26).

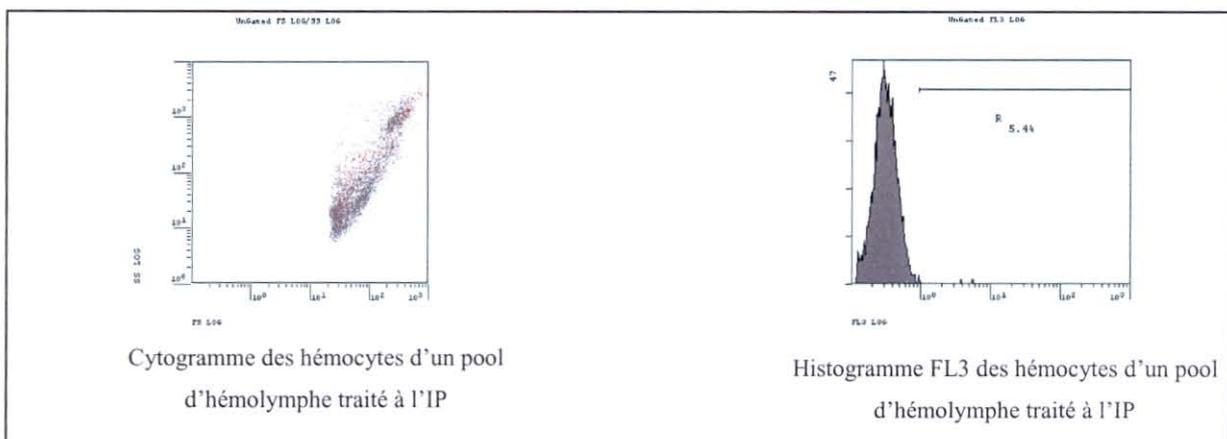


Figure 26 : Mortalité hémocytaire détectée en FL3 après incubation avec de l'IP

De la même façon un marquage au Syto9 montre que seulement 22% des évènements décomptés dans la fenêtre B contiennent des acides nucléiques, les autres évènements correspondent donc à des débris cellulaires ou des produits de dégranulation des hémocytes.

Afin de caractériser les interactions hémocytes – pathogène, les hémocytes (H) et le vibrion marqué TR32 (V) ont été utilisés selon le rapport V/H = 100 (Photos 7 (a) et (b)). Cette expérimentation a été réalisée en mars 2007 à partir d’animaux conditionnés dans les installations du LGP afin de les dépurer. Les cytogrammes de la figure 27 montrent qu’après seulement 5 min de contact l’association entre le vibrion et les hémocytes a déjà débuté puisque de nombreux hémocytes fluorescent en vert. Ces derniers représentent 27,2% des hémocytes totaux. Après 45 min de temps de contact, la proportion d’hémocytes fluorescents a fortement augmentée représentant 52,4 % des hémocytes totaux. Ce pourcentage d’hémocytes marqués est optimal de même que l’intensité de fluorescence des cellules, ce qui suggère l’existence d’un phénomène de saturation de la capacité de phagocytose des hémocytes. Des observations au microscope à épifluorescence et en lumière blanche ont confirmé ces résultats avec la mise en évidence d’hémocytes littéralement gorgés de vibrions et d’autres absolument non réactifs correspondant aux cellules les moins complexes (Photos 7 (c) et (d)). Après 90 min de contact, la population d’hémocytes chute. Une augmentation simultanée des bactéries TR32 libres détectées dans la fenêtre B est observée.

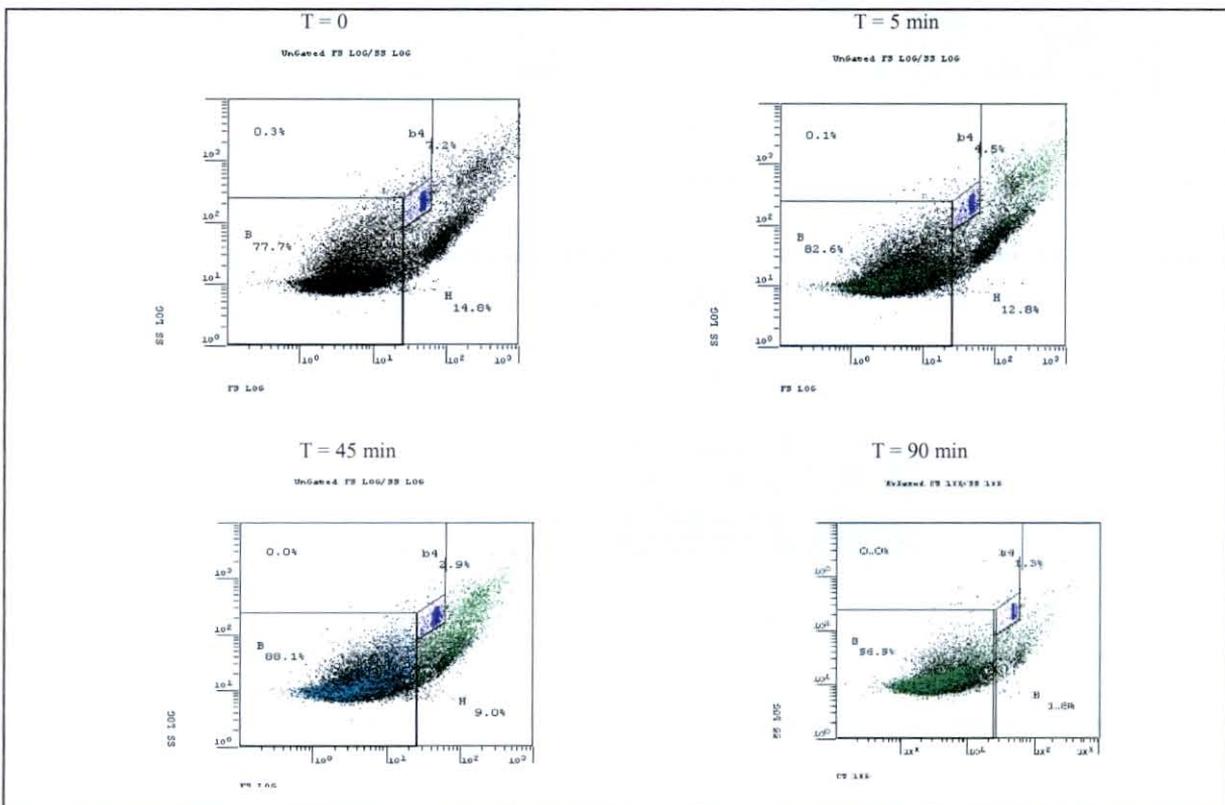
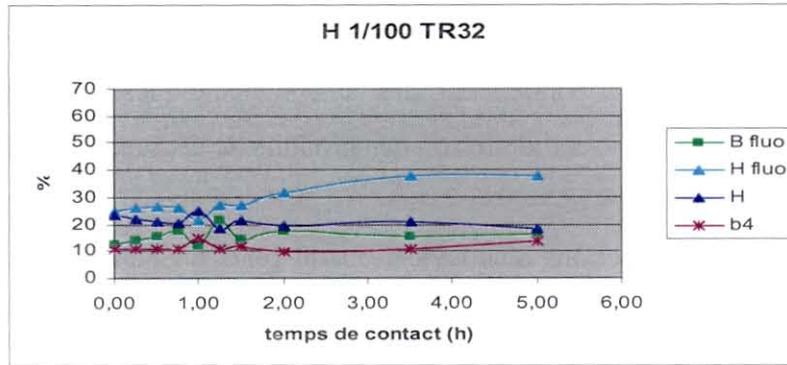
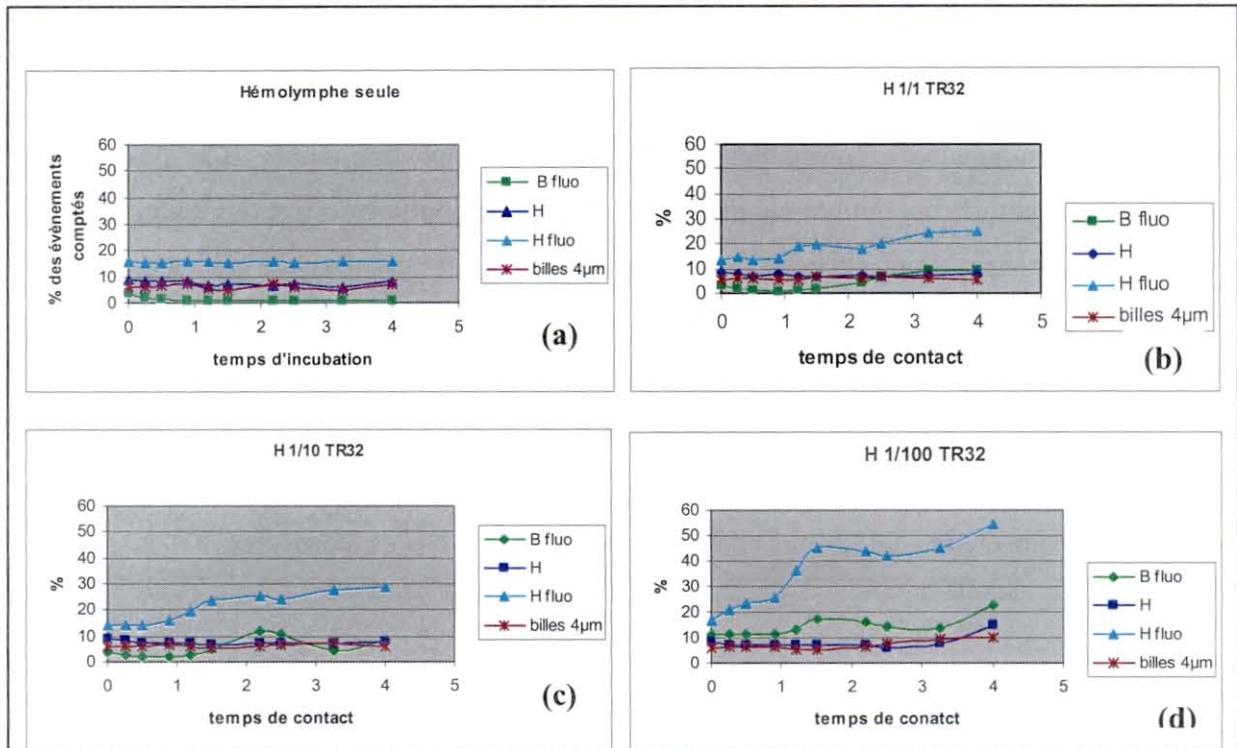


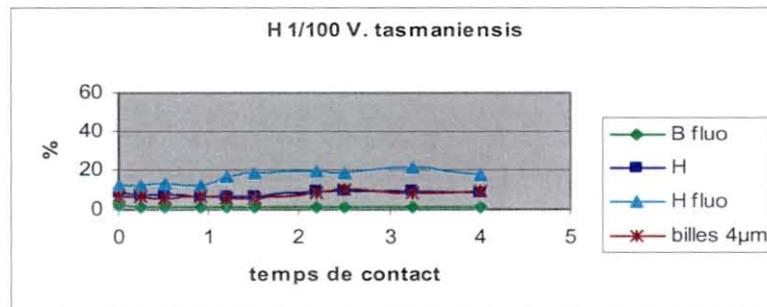
Figure 27 : Cytogrammes représentant l'évolution de l'hémolymphe lors d'un contact avec TR32 au rapport H/V=1/100



Graphique 3 : Evolution des composants de l'hémolymphe pendant un contact de 5 heures avec TR32



Graphique 4 : Evolution des composants de l'hémolymphe pendant un contact de 4 heures avec TR32 à différents ratios



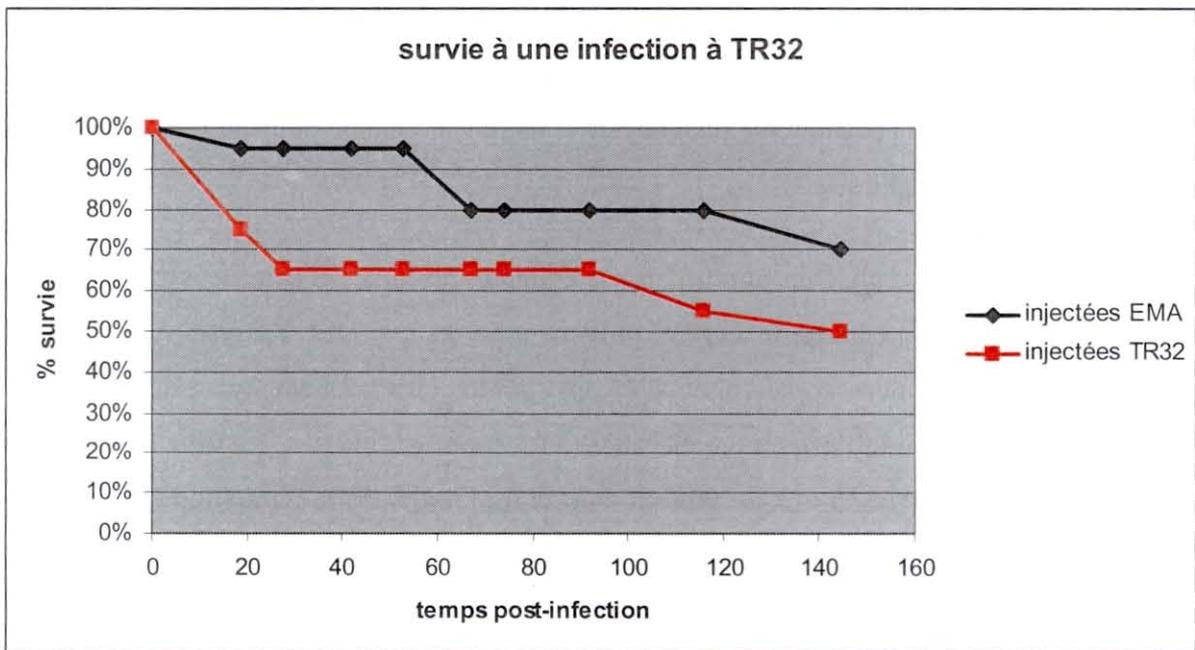
Graphique 5 : Evolution des composants de l'hémolymphe après un contact de 4 heures avec V. tasmaniensis

En parallèle le pourcentage de billes diminue de 7,2% à 1,3% ce qui révèle une augmentation du nombre d'évènements et donc une plus grande complexité de l'échantillon. En conclusion cette expérimentation a permis de mettre en évidence un possible effet cytopathogène de TR32 sur les hémocytes. L'augmentation du nombre d'évènements alors que les hémocytes diminuent peut s'interpréter comme étant le résultat d'une lyse des hémocytes avec relargage des vibrions fluorescents dans l'hémolymphe et augmentation du nombre de débris cellulaires.

D'autres essais ont été réalisés par la suite afin de confirmer l'hypothèse d'un effet cytopathogène induit par le pathogène LGP32. Dans ce contexte nous avons remarqué un comportement des hémocytes très différents selon l'origine des huîtres utilisées. En effet des essais en cytométrie de flux et en microscopie réalisés à partir d'autres pools d'hémolymphe n'ont pas permis de vérifier l'hypothèse d'un effet cytopathogène de LGP32, les hémocytes ne semblant pas avoir la capacité de phagocyter le pathogène même pour un temps de contact et ratio V/H élevés (graphique 3).

Un dernier essai a été réalisé en juin à partir d'animaux diploïdes n'ayant pas transités dans les installations expérimentales du LGP et provenant de claires. Des analyses en cytométrie (Graphique 4) et en microscopie (photos 7) ont montré que les hémocytes de ces huîtres étaient à nouveau réactifs. Différents ratio H/V (TR32) ont été utilisés, R=100, 10 ou 1 ainsi que la souche *tasmaniensis* à titre de vibrion témoin (graphique 5). Le graphique 4(a) indique une stabilité des évènements relatifs à l'hémolymphe utilisée seule et conservée à température ambiante, même au-delà de 4 heures d'incubation. Le pourcentage d'hémocytes fluorescents augmente avec le temps et est d'autant plus élevé que le rapport H/V est grand. Ainsi pour H/V=100, 54% d'hémocytes fluorescent après 4 heures de contact.

Comme observé lors du premier essai réalisé en mars, on note pour les ratios 10 et 100 l'existence d'un relargage de TR32 qui débute après 90 minutes de temps de contact. Quelque soit le ratio utilisé (graphique 4 (b), (c) et (d)), la population d'hémocyte est modifiée au cours du temps et de façon spécifique à TR32 par comparaison aux cytogrammes obtenus avec *tasmaniensis* qui sont similaires à ceux obtenus avec l'hémolymphe seule. En effet la population de cellules les plus complexes et les plus grandes en taille disparaît au profit de cellules plus petites mais plus complexes que les cellules hyalines. En revanche, contrairement à l'expérimentation réalisée en mars, il n'y pas de diminution des hémocytes totaux.



Graphique 6 : Survies suite à une infection expérimentale à TR32

De même la mortalité hémocytaire appréciée après marquage à l'IP n'évolue pas significativement que le pathogène soit présent ou non et quelque soit le ratio utilisé. Ainsi après 3 heures de contact la mortalité hémocytaire en présence de LGP32 est de 8,2 % en moyenne alors que celle du témoin (hémolymph seule) est de 7,4%.

In vivo : Suivi d'une pathologie induite expérimentalement (Annexe 9) :

Mortalités

Des huîtres d'environ 5 cm ont été infectées avec TR32 à la dose de 4.10^8 UFC/animal et séparées en deux lots l'un pour réaliser un suivi de mortalité (graphique 6) sur 20 animaux et l'autre en vue de réaliser des prélèvements journaliers (50 animaux). Un pic de mortalité a été observé 24 heures post-injection avec une diminution de 35% de l'effectif. Un deuxième pic de moindre amplitude (10%) a également été observé 4 jours post infection. Cinq jours après l'infection, la survie est de 55% contre 80% pour les témoins injectés avec de l'EMA.

Suivi de la pathogenèse par cytométrie de flux

Des ponctions d'hémolymph ont été réalisées au niveau du muscle adducteur et quelquefois de la cavité péricardique à différents temps post infection, chez des animaux morts récemment, moribonds ou vivants.

Durant les deux premiers jours post l'infection, les dénombrements bactériens réalisés sur hémolymph étalée sur boîte de Pétri en Zobell additionné de chloramphénicol révèlent des valeurs similaires quelque soit le statut des huîtres, de l'ordre de 10^4 UFC/ml. Quatre jours post-infection, les animaux morts ou moribonds présentent une charge en TR32 supérieure aux animaux survivants. Ainsi, on retrouve de l'ordre de 10^5 UFC TR32/mL d'hémolymph contre 10^3 à 10^4 UFC/mL pour les survivantes. Six jours après l'infection TR32 est encore mis en évidence chez les huîtres mortes alors que les huîtres survivantes en sont exemptes.

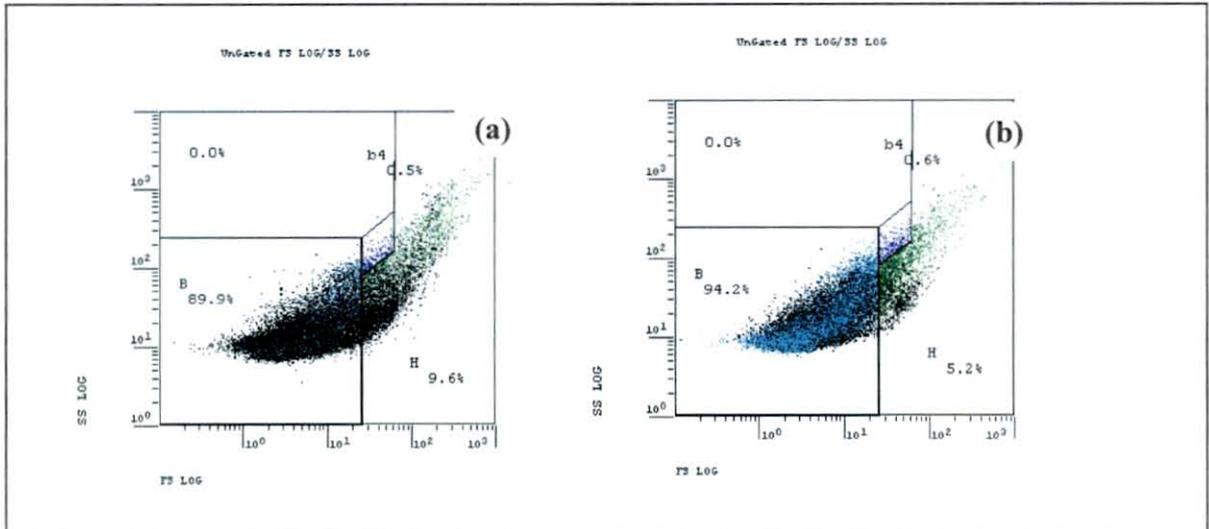


Figure 28 : Cytogrammes d'hémolymphe d'huître vivante (a) et morte (b) 2 jours après une infection expérimentale à TR 32

Ces résultats sont corrélés à ceux obtenus en cytométrie de flux. En effet, le pourcentage de bactéries fluorescentes est plus important dans l'hémolymphe d'huîtres mortes. Par exemple, à deux jours post-infection, quasiment la moitié des bactéries retrouvées libres dans l'hémolymphe des huîtres mortes fluorescent, à comparer aux 20% maximum détectés chez les huîtres vivantes au même temps (Figure 28). Les bactéries TR32 sont encore détectées, quoique plus faiblement, au quatrième jour post infection mais uniquement chez les animaux morts récemment avec des valeurs de 4 à 5% de bactéries fluorescentes.

Les analyses en cytométrie de flux effectuées révèlent que le pathogène est non seulement présent dans l'hémolymphe récoltée au niveau du muscle adducteur, ce qui n'est pas surprenant dans la mesure où cet organe constitue le lieu d'injection, mais également dans l'hémolymphe ponctionnée dans la cavité péricardique bien qu'en moins grande quantité. Ainsi deux jours post injection, on retrouve chez un même individu entre 5 et 20% de bactéries libres fluorescentes (5 huîtres analysées) dans la cavité péricardique contre 18 et 70% dans le muscle adducteur. Ces résultats n'ont été obtenus que sur des animaux morts ou moribonds.

Des coupes d'animaux ont également été réalisées afin de déterminer dans quels autres tissus le pathogène est détecté par immunohistologie. Cette localisation n'a pas pu être entreprise par manque de temps.

4.2.2. Diagnostic d'espèce de vibron à partir d'isolats bactériens

Durant ce stage nous avons été confrontés à des mortalités anormales d'huîtres (Annexe 10) destinées aux essais d'infections expérimentales pour la reproduction de la vibriose à *V. splendidus* ou aux tests réalisés *in vitro* pour l'étude des interactions hémocytes-vibrions. Ces huîtres d'origine diverses (huîtres commerciales ou issues de familles génétiques polyploïdes ou non) ont été maintenues dans les bacs des installations du LGP dans l'objectif de les dépurer. Des isollements bactériens ont été réalisés à partir de l'hémolymphe de ces animaux d'apparence sains, moribonds ou trouvés morts. Dans la plupart des cas des septicémies ont été diagnostiquées (Annexe 10) avec pour certains de ces individus une charge bactérienne monomorphe supérieure à 2.10^6 UFC/ml. Vingt huit isolats représentatifs de la flore bactérienne dominante ont été étudiés afin de les identifier taxonomiquement. Un diagnostic *V. aestuarianus* a été entrepris du fait que la majorité des isolats récoltés présentaient des colonies dont l'aspect est typique de cette espèce : colonies petites, blanches et au développement lent.

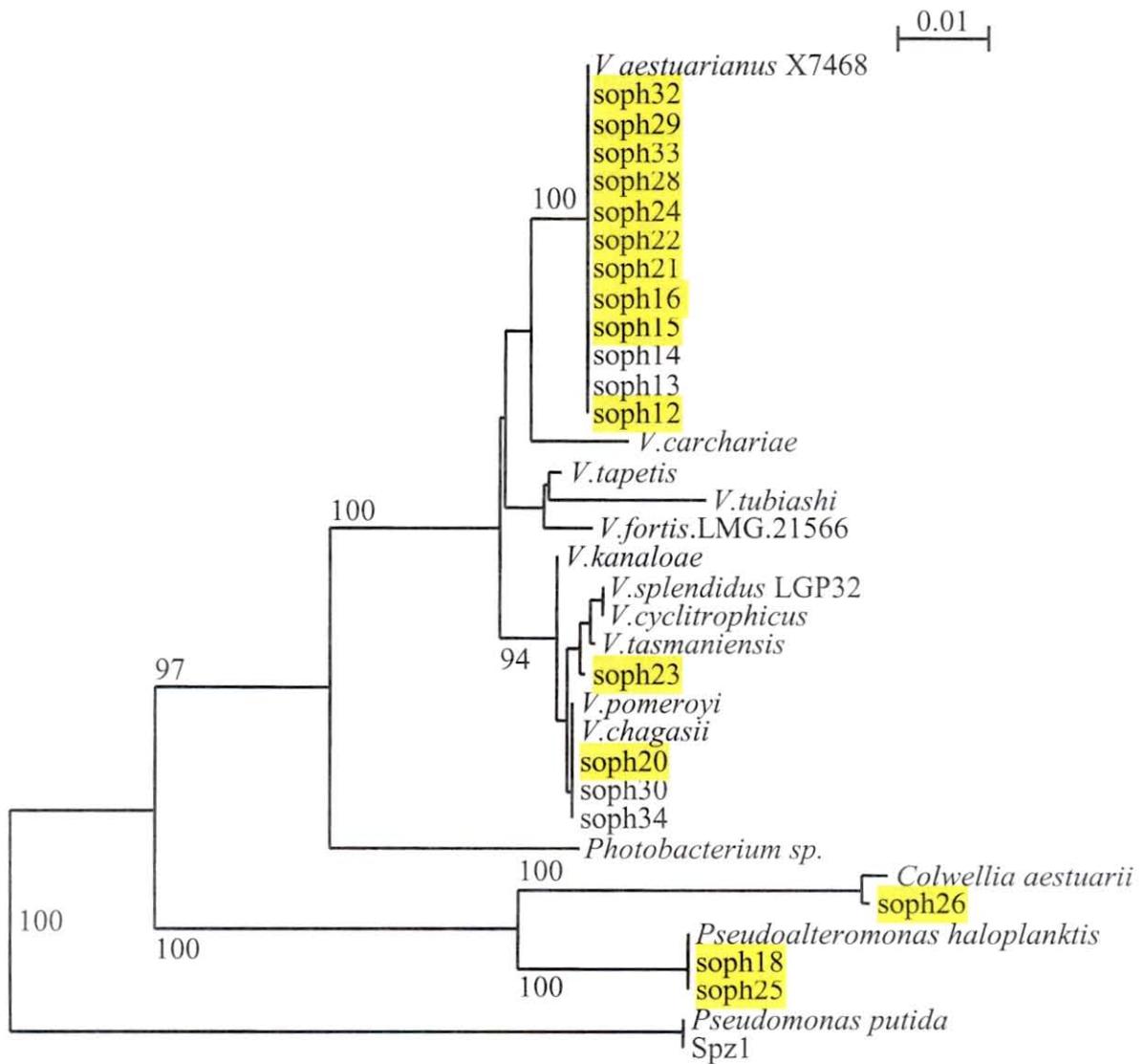


Figure 29 : Arbre phylogénétique réalisé à partir des alignements de séquences du gène ARN 16S. Trente cinq isolats bactériens ont été analysés sur 526 sites nucléotidiques en appliquant la méthode de Neighbour joining

L'ADN bactérien de ces isolats a été extrait sur papier Whatman (n=24) ou à l'aide d'un simple protocole d'ébullition pendant 10 min des colonies remises en suspension dans de l'eau (n=4). Les résultats révèlent que toutes les petites colonies (n=14/28) sont amplifiées par PCR à l'aide des amorces *gyrB*, confirmant leur appartenance à l'espèce *V. aestuarianus*, ainsi que deux autres isolats. D'autre part les essais d'amplification sur des ADN extraits en faisant bouillir les colonies et une colonie témoin (souche type *V. aestuarianus*) donnent des amplicons de la taille attendue, avec un signal d'amplification très intense.

La spécificité du diagnostic a été vérifiée en séquençant le gène *ARN 16S* des souches extraites sur confettis Whatman à l'aide d'amorces universelles. Au total de 19 souches ont générées une séquence exploitable. Une analyse phylogénétique sur la séquence de ces souches et d'autres souches dont la séquence nucléotidique est disponible dans les bases de données démontre une forte congruence (Figure 29 - souches *sophX* surlignées en jaune) entre les résultats obtenus à l'issue de deux PCR diagnostiques successives et le l'arbre phylogénétique. La congruence entre les méthodes est de $14/19 = 79\%$. Concernant les quatre souches ayant donné des résultats divergeant il convient de souligner que ce sont précisément celles ayant donné des résultats douteux à l'issue des deux PCR diagnostiques : faibles niveaux d'amplification, résultats divergents entre la 1^{ère} et la 2^{ème} PCR.

5. Discussions

5.1. Discussion méthodologique

Nous avons utilisé la cytométrie de flux entre autre comme un outil de détection des bactéries libres, présentes dans l'hémolymphe ou dans une suspension bactérienne. Du fait de leur petite taille, il faut systématiquement travailler avec des diluants peu complexes. Comme l'EMA peut former des cristaux de sels, il est nécessaire de l'utiliser centrifugée et filtrée à 0.22 μ m.

Le réglage des paramètres de détection de la fluorescence est souvent difficile lorsqu'on souhaite utiliser plusieurs fluorochromes différents en raison des effets de compensation engendrés. C'est pourquoi, nous avons décidé de ne pas utiliser plusieurs fluorochromes dans un même tube de cytométrie mais de réaliser pour un même échantillon les différents marquages dans des tubes différents.

La quantification des bactéries libres ne peut se faire directement par l'appareil en raison du mode de fonctionnement de celui-ci. C'est la raison pour laquelle nous avons développé un outil de calibration à l'aide de billes de 4 μ m. De plus, ces billes sont idéales dans les types de prélèvements que nous avons réalisées car elles apparaissent bien séparées des constituants habituels de l'hémolymphe de l'huître creuse sur le cytogramme et donc elles n'interfèrent pas dans les résultats de comptage des hémocytes ou des bactéries.

Le marquage de bactéries mortes traitées à l'IP est difficilement réalisable. En effet la plupart des bactéries naturellement mortes ne sont pas marquées avec de l'IP et il faut utiliser des traitements draconiens (3% H₂O₂) afin de suffisamment léser la paroi bactérienne et permettre au fluorochrome de diffuser dans le cytosol. Ces doses sont très certainement largement supérieures à celles que les hémocytes peuvent produire durant la phagocytose (production de radicaux oxygénés et d'H₂O₂), donc l'IP ne peut pas être utilisé comme marqueur de mortalité bactérienne afin notamment de connaître la part de bactéries mortes ou vivantes obtenues lors de la phagocytose. Une autre limite existe à l'utilisation de l'IP comme marqueur de mortalité cellulaire : la cellule doit rester intègre pour être détectée comme étant un hémocyte par le cytomètre. Les hémocytes lysés ne sont donc pas dénombrables.

Le Syto9 pour sa part est un très bon marqueur nucléique car il présente une fluorescence intense et de ce fait permet une détection avec des sensibilités plus faibles que celles nécessaires à la détection de la GFP ce qui minimise les phénomènes d'autofluorescence inhérents à tout prélèvement. En revanche le Syto9 n'est pas un marqueur stable des bactéries. En effet des expérimentations réalisées afin d'évaluer la stabilité du marquage des bactéries au Syto9 pour une utilisation dans le cadre d'une mise en contact des hémocytes avec les vibrions, ont montré que lors des dilutions en EMA, le vibron devient de moins en moins marqué semblant se débarrasser du Syto9. C'est pourquoi, les expérimentations réalisées dans le but de décrire la phagocytose n'ont pu être réalisées que sur TR32, seule vibron pour lequel le gène de la GFP est intégré au niveau chromosomique et dont plus de 98% des cellules expriment cette protéine fluorescente.

Nous avons choisi d'effectuer une mise en contact *in vitro* des bactéries TR32 avec l'hémolymphe totale plutôt qu'avec les hémocytes seuls car, dans le deuxième cas, il faut effectuer une centrifugation préalable afin de culotter les hémocytes avec un risque de perte et de fragilisation des hémocytes. De plus, dans le premier cas les constituants de l'hémolymphe, potentiellement actifs dans le processus de phagocytose, sont conservés (lectines notamment) et le travail facilité par un nombre de manipulations réduites.

Dans le cadre de ce stage des tests de diagnostic d'espèces ont été développés. Pour cela nous avons choisi d'extraire les ADN bactériens par dépôt sur papier Whatman car ce protocole permet une excellente conservation des échantillons supérieure à 10 ans. De plus, plusieurs confettis peuvent être réalisées sur un même dépôt (>20) soit autant de PCR classiques. La méthode d'extraction par ébullition des colonies a également été testée et les résultats ont donné pleine satisfaction. Cette seconde technique est plus rapide car elle ne nécessite ni de recueillir la souche en bouillon, ni une extraction fastidieuse. D'autres techniques d'extraction pourraient également être envisagées.

Le développement d'un outil diagnostique moléculaire a été entrepris afin de permettre la mise en place de mesures rapides en cas de mortalités d'huîtres. En effet, les outils classiques d'identification taxonomique sont dispendieux en temps et en coût et les résultats de certains tests phénotypiques quelques fois variables. C'est pourquoi la PCR quantitative, plus rapide et sensible que la PCR classique, a été développée lors de ce stage et ce malgré un coût plus élevé. Elle permet en outre d'obtenir des données quantitatives : nombre de génomes bactériens d'intérêt présents dans un échantillon donné.

5.2. Discussion des résultats

Les expérimentations réalisées afin de réduire la flore normale de l'huître ont été réalisées en eau décantée puis filtrée. Ils nous ont notamment permis de mettre en évidence l'existence d'une flore variable d'un point de vue quantitatif, fluctuant selon la saison. En effet les premiers résultats obtenus en février ont mis en évidence une flore normale comprise entre 2.10^2 et $8,5.10^3$ UFC/mL alors qu'en mai, elle variait de 8.10^2 à $4,2.10^4$ UFC/mL. Ces variations saisonnières de la flore normale de l'huître sont également décrites dans la littérature avec des valeurs proches de celles que nous avons retrouvées et variant de 3.10^3 à 3.10^5 selon la saison (Maeda et al. 2003; Thompson et al. 2004b). Les essais de dépuración des huîtres se sont avérés satisfaisants avec une diminution de la flore bactérienne de l'hémolymphe à des niveaux similaire à celle présente dans l'eau dans laquelle les huîtres sont stabulées. Cette dépuración semble nécessaire afin de normaliser la flore de l'huître en vue de standardiser les protocoles d'étude des interactions huîtres – vibrions et ceux relatifs à l'évaluation du pouvoir pathogène des isolats bactériens (infections expérimentales).

Ces expérimentations ont également permis de mettre en évidence une fluctuation bactérienne quantitative dans l'eau d'élevage des huîtres utilisée dans les installations du LGP. Ce constat révèle les insuffisances du traitement de l'eau d'alimentation des bacs d'élevage quand la charge bactérienne dans l'environnement est plus élevée, et ce malgré le fait qu'elle soit décantée puis filtrée. Afin de minimiser le risque d'intrusion d'un pathogène dans ces installations, il serait judicieux d'ajouter un dispositif supplémentaire de traitement aux UV de l'eau d'entrée alimentant les bacs d'élevage.

Les expérimentations réalisées lors de ce stage ont permis de démontrer qu'un phénomène actif d'interaction existe entre les hémocytes de l'huître et le *Vibrio* LGP32. En effet dans certains cas, des mécanismes de phagocytose accompagnés ou non d'un effet cytopathogène ont été mis en évidence. Cependant, plusieurs expérimentations ont révélé que les hémocytes ne présentaient aucune capacité de phagocytose. Les hémolymphes présentant cette particularité provenaient d'animaux stabulés dans les installations du LGP pour y être dépurées. Lors de ce stage nous avons démontré que *V. aestuarianus* était responsable de certains épisodes de mortalités rencontrés dans les installations expérimentales du LGP et que les animaux présentant une incapacité de phagocytose *in vitro* vis à vis de TR32 étaient présents dans les bacs d'élevage à cette période. Des surnagants de culture ou ECP (extra-cellular products) produits par *V. aestuarianus* ont été décrits comme étant inhibiteurs de la phagocytose évaluée à l'aide de billes inertes fluorescentes (Labreuche et al. 2006a; Labreuche et al. 2006b). De ce fait il est probable que l'absence de phénomène de phagocytose observée lors de nos essais *in vitro* s'explique par le fait que les huîtres étaient infectées par ce vibron.

Les hémocytes qui phagocytent le plus semblent être les plus gros et les plus complexes c'est-à-dire les granulocytes mais la cinétique est différente suivant l'origine ou la période de l'analyse. On observe ainsi un pic de fluorescence à temps variables allant de 45 min à 4 heures puis, dans certains cas, un déclin important du nombre d'hémocytes fluorescents et totaux accompagné d'une diminution du nombre de billes dénombrées ce qui correspond à une augmentation des autres évènements, révélant une complexification de l'échantillon. Ces observations pourraient révéler un éclatement des hémocytes qui va de pair avec l'augmentation du pourcentage de TR32 dans le compartiment B, que nous avons maintes fois observé. Ce phénomène n'est pas retrouvé avec la bactérie avirulente *V. tasmaniensis*. Il est donc probable qu'un effet cytopathogène des bactéries virulentes vis à vis des hémocytes avec libération des TR32 intra-hémocytaires toujours fluorescents et, de ce fait, probablement toujours vivants existe. Cette hypothèse mérite d'être confirmée.

Les expérimentations réalisées en diagnostic moléculaire ont donné des résultats très encourageants. Le diagnostic de 3 espèces de *Vibrio* par PCR classique s'est révélé sensible et spécifique. Tous ces résultats ont été obtenus à partir de colonies pures maintenues à -80°C, revivifiées en milieu liquide, avant que leurs ADN ne soient extraits sur papier FTA ou par ébullition des colonies pures. Dans les deux cas il est nécessaire de réaliser des étalements sur boîte avant toute analyse par PCR. Cette contrainte permet toutefois de sélectionner et d'isoler spécifiquement le type de colonie majoritaire.

Les résultats obtenus en PCR quantitative ont confirmés les résultats de la PCR classique. En effet, les couples d'amorces sélectionnées fonctionnent correctement et avec une bonne spécificité.

Une PCR combinatoire mêlant les trois couples d'amorces dans les mêmes conditions a été envisagée avec une identification du signal grâce aux Tm obtenus à partir de l'analyse des courbes de dissociation. Cependant, après superposition des 3 courbes de dissociation nous avons remarqué que les espèces *V. aestuarianus* et *V. coralliitycus* ne peuvent pas être différenciés par leur Tm. De ce fait, des expérimentations utilisant la technologie Taqman® sont envisagés car malgré le coût plus élevé de cette méthode, elle pourrait permettre la discrimination des trois espèces. En effet, cette technique est basée sur l'utilisation de sondes spécifiques au fragment à amplifier et marquées chacune à l'aide d'un fluorochrome différent. Ainsi, en utilisant 3 sondes Taqman, ciblant chacune le gène d'intérêt choisi, (*ARN 16S*, *gyrB* et *toxR*) marquées avec des fluorochromes différents, il sera alors possible d'identifier l'une des trois espèces de vibron d'intérêt lors d'une seule réaction de PCRq. De plus, la PCRq avec sonde Taqman permet d'augmenter la spécificité de la réaction puisque les amplicons non spécifiques ne peuvent s'hybrider à la sonde et n'émettent par conséquent aucun signal de fluorescence. De ce fait cette stratégie de PCR quantitative est particulièrement intéressante pour l'optimisation des amplifications réalisées avec les couples d'amorces spécifiques de *V. splendidus* et *V. aestuarianus*. En effet ces amorces peuvent générer dans certaines conditions des produits non spécifiques ou des dimères d'amorces.

Conclusion

Lors de ce stage des tests de diagnostic des espèces *V. splendidus*, *V. aestuarianus* et *V. coralliitycus* ont été développés par PCR classique et sont en cours d'optimisation. L'application de cette méthode à la recherche de *V. aestuarianus* chez des huîtres confrontées à des épisodes de mortalité au sein des installations du LGP s'est avérée satisfaisante puisque les résultats obtenus par phylogénie moléculaire, dispendieux en temps et en coût, et par PCR classiques sont congruents. L'application en PCR quantitative est en cours avec des résultats encourageants malgré la formation de produits non spécifiques pour les amorces ciblant *V. splendidus* et *V. aestuarianus*. La discrimination lors d'une seule réaction de PCRq des trois espèces est difficilement réalisable par la méthode SybrGreen du fait des Tm des espèces *aestuarianus* et *coralliitycus* trop proches donc des expérimentations avec la stratégie Taqman sont envisagées afin d'augmenter la spécificité du test et de permettre une identification des 3 espèces de vibron en une seule réaction (gain de temps et économie de réactifs).

Ce stage a également permis de démontrer l'existence d'un phénomène de phagocytose parfois associé à un effet cytopathogène. La capacité de phagocytose s'est avérée variable selon les animaux considérés et de nombreux facteurs semblent influent sur ce phénomène et notamment l'influence d'une infection préalable à *V. aestuarianus*. D'autres essais doivent être envisagés afin de confirmer ou d'affirmer l'existence de l'effet cytopathogène mis en évidence lors d'une des expérimentations et le rôle de *V. aestuarianus* dans ce processus. De plus, une étude individuelle ou sur des familles génétiques contrastées serait intéressante afin de mesurer la variabilité liée aux facteurs génétiques propres à chaque huître ou famille.

Références bibliographiques :

- Armada, S.P., Farto, R., Perez, M.J2 and Nieto, T.P. (2003). "Effect of temperature, salinity and nutrient content on the survival responses of *Vibrio splendidus* biotype I." Microbiology **149**(Pt 2): 369-75.
- Austin, B. and Austin, D.A. (1999). Bacterial fish pathogens: diseases of farmed and wild fish, vol Praxis publishing. London, Springer.
- Bogard and Lamoril (1998). Biologie moléculaire en biologie clinique. B. s.a., Elsevier. **I. Méthodes**: 119-145.
- Borrego, J.J. , D., Castro, A., Luque, C., Paillard, P., Maes, M.T., Garcia and A., Ventosa (1996). "*Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams." Int. J. Syst. Bacteriol. **46**: 480-484.
- Chen, C. Y., Wu, K. M., Chang, Y. C., Chang, C. H., Tsai, H. C., Liao, T. L., Liu, Y. M., Chen, H. J., Shen, A. B., Li, J. C., Su, T. L., Shao, C. P., Lee, C. T., Hor, L. I. and Tsai, S. F. (2003). "Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen." Genome Res **13**(12): 2577-87.
- Cheng, T.C. (1981). Bivalves. Invertebrate Blood Cells
R. A. Ratcliffe NA. London, Academic press. **1**: 231-300.
- Chu, F., -L.E. (2000). Defense mechanisms of marine bivalve. Recent Advance in Marine Biotechnology, Immunobiology and Pathology. M. F. a. R. Nagabhusanam. Enfield,NH, Plymouth, UK, Science Publishers. **5**: 1-42.
- Colwell, R. R. and Liston, J. (1960). "Microbiology of shellfish. Bacteriological study of the natural flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*)." Appl Microbiol **8**: 104-9.
- Elston, R. and Leibovitz, L. (1980). "Pathogenesis of experimental vibriosis in larval american oysters, *Crassostrea virginica*." Can J Fish Aquat Sci **37**: 964-978.
- Euzeby, J.P. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet, Int J Syst Bacteriol.
- Faury, N., Saulnier, D., Thompson, F. L., Gay, M., Swings, J. and Le Roux, F. (2004). "*Vibrio crassostreae* sp. nov., isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*)." Int J Syst Evol Microbiol **54**(Pt 6): 2137-40.
- Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Burgeot, T. and Renault, T. (2006). "Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry." Cell Biol Toxicol **22**(1): 1-14.
- Gay, M., Berthe, F. C. and 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. and Le Roux, F. (2004b). "Two *vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations." Dis Aquat Organ **62**(1-2): 65-74.
- Gibson and Muse (2004). Précis de génomique d. b. L. s.a., de boeck: 63-76, 157-159.
- Gonzalez, M., Gueguen, Y., Desserre, G., de Lorgeril, J., Romestand, B. and Bachere, E. (2007). "Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*." Dev Comp Immunol **31**(4): 332-9.

- Gueguen, Y., Herpin, A., Aumelas, A., Garnier, J., Fievet, J., Escoubas, J. M., Bulet, P., Gonzalez, M., Lelong, C., Favrel, P. and Bachere, E. (2006). "Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*. Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression." J Biol Chem **281**(1): 313-23.
- Hagstrom, A., Pommier, T., Rohwer, F., Simu, K., Stolte, W., Svensson, D. and Zweifel, U. L. (2002). "Use of 16S ribosomal DNA for delineation of marine bacterioplankton species." Appl Environ Microbiol **68**(7): 3628-33.
- Heidelberg, J. F., Eisen, J. A., Nelson, W. C., Clayton, R. A., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Umayam, L., Gill, S. R., Nelson, K. E., Read, T. D., Tettelin, H., Richardson, D., Ermolaeva, M. D., Vamathevan, J., Bass, S., Qin, H., Dragoi, I., Sellers, P., McDonald, L., Utterback, T., Fleishmann, R. D., Nierman, W. C., White, O., Salzberg, S. L., Smith, H. O., Colwell, R. R., Mekalanos, J. J., Venter, J. C. and Fraser, C. M. (2000). "DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*." Nature **406**(6795): 477-83.
- Hine, P.M. (1999). "The inter-relationships of bivalve haemocytes." fish & shellfish Immunology **9**: 367-385.
- Howland, K.H. and Cheng, T.C. (1982). "Identification of bacterial chemoattractants for oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes." Journal of Invertebrate Pathology **39**: 123-130.
- Kita-Tsukamoto, K., Oyaizu, H., Nanba, K. and Simidu, U. (1993). "Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family *Vibrionaceae*, determined on the basis of 16S rRNA sequences." Int J Syst Bacteriol **43**(1): 8-19.
- Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A. and Nicolas, J. L. (2006a). "Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32." Microbes Infect **8**(12-13): 2715-24.
- Labreuche, Y., Soudant, P., Goncalves, M., Lambert, C. and Nicolas, J. L. (2006b). "Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*." Dev Comp Immunol **30**(4): 367-79.
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gelebart, F., Cordevant, C., Lange, M. and 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 Organ **46**(2): 139-45.
- Le Roux, F., Binesse, J., Saulnier, D. and Mazel, D. (2007). "Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counterselectable suicide vector." Appl Environ Microbiol **73**(3): 777-84.
- Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Nicolas, J. L., Gouy, M. and Berthe, F. (2004). "Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences." Dis Aquat Organ **58**(2-3): 143-50.
- Le Roux, F., Goubet, A., Thompson, F. L., Faury, N., Gay, M., Swings, J. and Saulnier, D. (2005). "*Vibrio gigantis* sp. nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*)." Int J Syst Evol Microbiol **55**(Pt 6): 2251-5.
- Maeda, T., Matsuo, Y., Furushita, M. and Shiba, T. (2003). "Seasonal dynamics in a coastal *Vibrio* community examined by a rapid clustering method based on 16S rDNA." Fisheries Science **69**: 385-394.

- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M., Yamashita, A., Kubota, Y., Kimura, S., Yasunaga, T., Honda, T., Shinagawa, H., Hattori, M. and Iida, T. (2003). "Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*." Lancet **361**(9359): 743-9.
- Montagnani, C., Avarre, J. C., de Lorgeril, J., Quiquand, M., Boulo, V. and Escoubas, J. M. (2007). "First evidence of the activation of Cg-timp, an immune response component of Pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway." Dev Comp Immunol **31**(1): 1-11.
- Pipe, R. K. (1990). "Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*." Histochem J **22**(11): 595-603.
- Prieur, D. (1981a). "Les relations entre mollusques bivalves et bactéries hétérotrophes en milieu marin. Etude analytique et expérimentale." thèse de doctorat d'Etat en Sciences Naturelles, Brest.: 226.
- Prieur, D. (1981b). "Nouvelles données sur les relations entre bactéries et bivalves marins." Hialotis **11**: 251-9.
- Soderhall, K. and Smith, V. J. (1983). "Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution." Dev Comp Immunol **7**(2): 229-39.
- Soletchnik, P., Faury, N., Razet, D. and Gouletquer, P. (1998). "Hydrobiology of the Marennes-Oléron bay. Seasonal indices and analysis of trends from 1978 to 1995." hydrobiologia **386**: 1-3.
- Takahashi, K. G., Nakamura, A. and Mori, K. (2000). "Inhibitory effects of ovoglobulins on bacillary necrosis in larvae of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*." J Invertebr Pathol **75**(3): 212-7.
- Thompson, F. L., Iida, T. and Swings, J. (2004a). "Biodiversity of vibrios." Microbiol Mol Biol Rev **68**(3): 403-31, table of contents.
- Thompson, F. L. and Klose, K. E. (2006). "*Vibrio*2005: the First International Conference on the Biology of *Vibrios*." J Bacteriol **188**(13): 4592-6.
- Thompson, J. R., Randa, M. A., Marcelino, L. A., Tomita-Mitchell, A., Lim, E. and Polz, M. F. (2004b). "Diversity and dynamics of a north atlantic coastal *Vibrio* community." Appl Environ Microbiol **70**(7): 4103-10.
- Visick, K. L. (2005). "Layers of signaling in a bacterium-host association." J Bacteriol **187**(11): 3603-6.
- Waechter, M., Le Roux, F., Nicolas, J. L., Marissal, E. and Berthe, F. (2002). "Characterization of pathogenic bacteria of the cupped oyster *Crassostrea gigas*." C R Biol **325**(3): 231-8.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P. and Trüper, H.G. (1987). "Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics." Int. J. Syst. Bacteriol **37**: 463-464.
- Yamaichi, Y., Iida, T., Park, K. S., Yamamoto, K. and Honda, T. (1999). "Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*: presence of two chromosomes in *Vibrio* species." Mol Microbiol **31**(5): 1513-21.

Liste des annexes

Annexe 1 : liste des souches de <i>Vibrio</i> utilisées.....	1
Annexe 2 : composition des milieux de culture :	2
Annexe 3 : le cytomètre de flux.....	3
Annexe 4 : protocole d'extraction de l'ADN bactérien sur papier FTA	4
Annexe 5 : protocole pour le séquençage	5
Annexe 6 : protocole permettant la réalisation de l'abaque pour la quantification des bactéries par cytométrie de flux	6
Annexe 7 : tableau de résultats de l'expérimentation d'épuration	7
Annexe 8 : tableaux de résultat des expérimentations de mise en contact des <i>Vibrio</i> avec l'hémolymphe d'huître.....	8
Annexe 9 : tableau de suivi d'une infection expérimentale d'huître avec TR32	10
Annexe 10 : tableau récapitulatif des prélèvements effectués lors de l'épisode de mortalité rencontré lors de ce stage dans les installations du LGP	11

Annexe 1 : liste des souches de *Vibrio* utilisées.

N° souche	Nom souche	espece	Souche type
1	LMG4042T	splendidus	T
2	LMG16745	chagasii	
3	CIP107166T	lentus	T
4	LMG20012T	tasmaniensis	T
5	LMG20537T	pomeroi	T
6	LMG20539T	kanaloae	T
7	LMG19999	pacinii	T
8	LMG21353T	chagasii	T
9	LGP7T	crassostreae	T
10	LMG21558	fortis	
11	LMG21557	fortis	
12	LMG20547	fortis	T
13	LMG21561	fortis	
14	LMG21562	fortis	
15	LMG21359T	cyclitrophicus	T
16	LMG21580	cyclitrophicus	
17	LMG21576	tasmaniensis	
18	LMG21523	kanaloae	
19	LMG21352	pomeroi	
20	LMG3897	pelagius	T
21	CIP103195T	nigripulchitudo	T
22	CIP1044175T	penaeicida	T
23	LGP8	crassostreae	
24	LGP13	gigantis	T
25	LGP45	gigantis	
26	03/008	aestuarianus	T
27	06/210	coralliitycus	
28	LMG21565	fortis	
29		superstes	T
30		brasiliensis	T
31		penaeicida	T
32		gallicus	T
33		ezurae	T
34		xuii	T
35		rotiferianus	T
36		mediterranei	T
37	DSMZ9896T	Photobacterium iliosarium	T
38	DSMZ13774T	shilonii	T
39	06/225	coralliitycus	
40	06/221	coralliitycus	
41	06/210	coralliitycus	
42	06/211	coralliitycus	
43	06/209	coralliitycus	

Annexe 2 : composition des milieux de culture :

Zobell Liquide:

- 1g extrait de levure,
- 4g peptone,
- 1L EMA 1x,
- + chloramphénicol

Zobell Solide:

- 15g agar agar,
- 1g extrait de levure,
- 4g peptone,
- 1L EMA 1x,
- + chloramphénicol

EMA 10x:

- 234g NaCl,
- 15g KCl,
- 12g MgSO₄, 7H₂O,
- 2g CaCl₂, 2H₂O,
- qsp1L eau distillée (salinité 2,6‰)

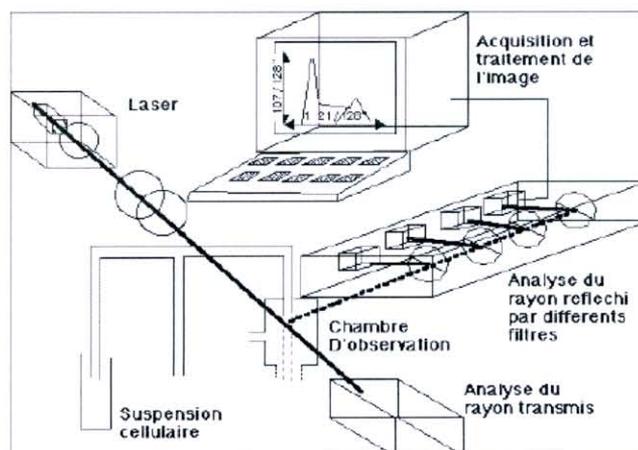
Annexe 3 : le cytomètre de flux

La cytométrie de flux consiste à étudier les caractéristiques physiques et chimiques de particules (cellules) entraînées dans un flux liquide. Les cellules sont excitées par un laser et émettent en réponse un rayonnement qui permet d'obtenir des informations multiples les concernant. Ces informations sont obtenues soit directement (autofluorescence des cellules), soit indirectement par l'intermédiaire de fluorochromes (marqueurs cellulaires). Un cytomètre de flux est constitué d'une composante fluidique, d'une composante optique et d'une composante électronique qui sont gérées au moyen d'une interface informatique. L'appareil utilisé dans cette étude est un EPICS XL 4 (Beckman Coulter).

La source lumineuse est constituée d'un laser à ions argon qui produit une lumière monochromatique (488 nm), unidirectionnelle et stable. Des lentilles permettent de focaliser le faisceau laser. Après excitation des cellules par le laser, les signaux émis sont transmis à des détecteurs ou ils sont mesurés et quantifiés. Les signaux sont ensuite amplifiés par des photomultiplicateurs et transformés en signaux électriques. Une fois le tri réalisé, les données sont analysées et rapportées sous forme d'histogrammes ou de cytogrammes grâce à l'interface informatique.

Une mesure directe (sur les cellules non marquées) peut être effectuée. Les paramètres ainsi mesurés sont la taille (Forward Scatter Height, FSC) et la complexité (Size Scatter Height, SSC) des cellules étudiées.

Certaines analyses nécessitent l'utilisation de fluorochromes (marqueurs cellulaires). Elles se basent sur la capacité de ces composés à absorber l'énergie lumineuse à une longueur d'onde donnée, puis de la réémettre à une longueur d'onde différente après excitation. Le cytomètre EPICS XL 4 (Beckman Coulter) possède quatre lentilles permettant de recueillir quatre plages de longueurs d'ondes différentes : le vert de 500 à 550 nm (détecteur FL1), le jaune de 550 à 600 nm (détecteur FL2), l'orange et le rouge de 560 à 670 nm (détecteur FL3), et le rouge uniquement de 640 à 700 nm (détecteur FL4).



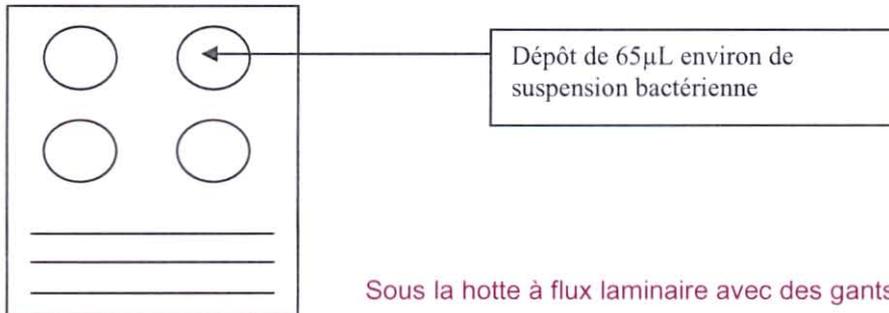
Annexe 4 : protocole d'extraction de l'ADN bactérien sur papier FTA

○ Extraction :

A partir d'une culture pure en bouillon de 24h

Sous la hotte à flux laminaire avec des gants

- déposer environ 65µL de bouillon dans le cercle du papier FTA à l'aide d'une pipette de 1mL
- laisser sécher 1 h en relevant la plaque
- refermer le papier et conserver dans une enveloppe prévue à cet effet en présence d'un disséquant (sachet 1g) à température ambiante



Laisser sécher 1h (conservation à température ambiante dans une enveloppe avec disséquant)

○ Purification :

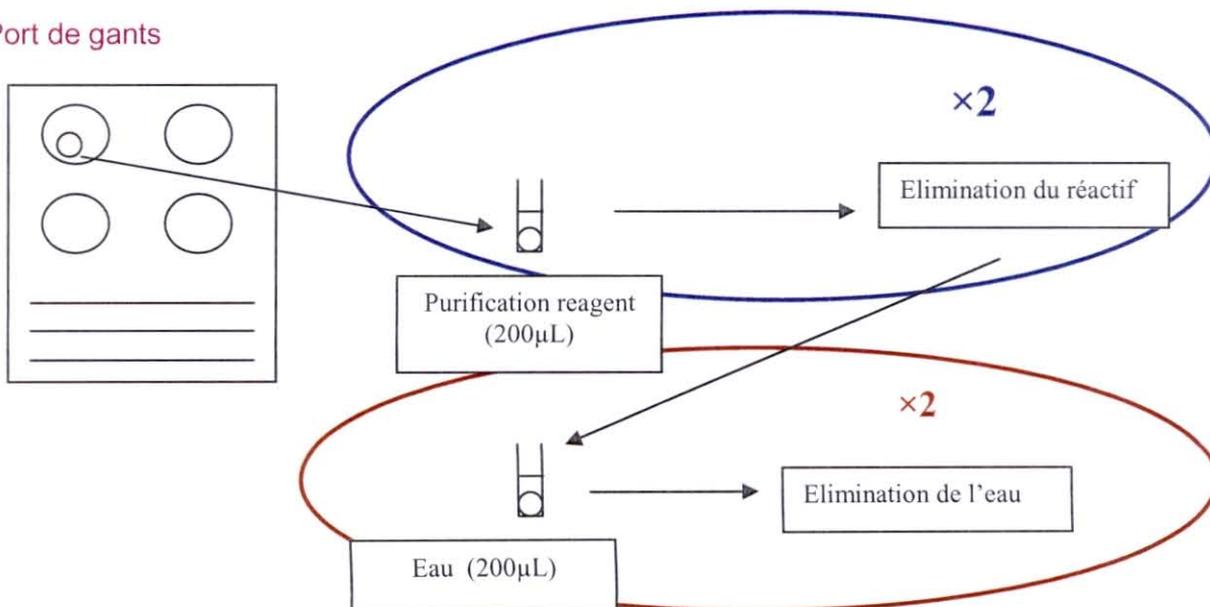
La PCR doit être effectuée dans les 3 h suivant cette opération.

Port de gants

- découper un disque à l'aide d'un emporte pièce de 1.25mm de diamètre et le déposer dans un tube PCR
- « laver » l'emporte pièce en découpant des disques (2) sur le papier où rien n'a été déposé
- laver le disque avec le purification reagent de chez whatman : ajouter 200µl de ce réactif dans le tube PCR et laisser 5 min. ensuite retirer tout le réactif. Effectuer cette opération 2 fois
- rincer le disque avec de l'eau bio mol (sigma) : 200µL d'eau dans le tube PCR. Laisser 5 min et retirer l'eau. Effectuer le rinçage 2 fois

Le disque ainsi purifié ne contient plus que l'ADN et sert d'échantillon pour la PCR

Port de gants



Annexe 5 : protocole pour le séquençage

Préparation de la réaction de séquence

Préparer 2 MIX : 1 par amorce « Sens ou Anti-sens »	
Tampon Big Dye	1,8 µL
Amorce 4 µM « Sens ou Anti-sens »	1,5 µL
MIX bdv3 (conserver à l'obscurité et sur glace)	0,4 µL
H2O qsp	10.0 µL
+ADN purifié	

Centrifuger rapidement

PCR : Dénaturation initiale

96°C 1 mn

puis 25 cycles

96°C 10 s
50°C 5 s
60°C 4 mn
4°C

Précipitation

Attention : Préserver la plaque le plus possible de la lumière

- Déposer 5 µL EDTA 125mM dans le fond du puits sur l'échantillon
- Ajouter 60 µL d'éthanol 100° (conserver au congélateur)
- Reboucher et retourner 4 fois la plaque
- Incuber 15 mn à Température Ambiante, protéger par de l'aluminium
- Centrifuger 30mn à 3000 g à 4°C :
- Vider le surnageant par retournement de la plaque
- Disposer la plaque retournée sur une couche de papier absorbant et centrifuger jusqu'à monter à 185g
- Ajouter 60 µL Ethanol à 70° préparer avec de l'eau BM conservé à -20°C
- Centrifuger 15 mn à 1650 g à 4°C
- Vider le surnageant par retournement de la plaque
- Disposer la plaque retournée sur une couche de papier absorbant et centrifuger 1 mn à 185g
- Sécher au speed-vac 15 mn avec dépression
- Reprendre avec 10 µL de Formamide
- Reprendre les culots et laisser au moins ½ heure à 4°C au frigo

Séquencage

Avant de passer la plaque

- Dénaturer 6 mn à 96°C
- Placer sur glace+eau pour refroidir rapidement
- Placer dans le séquenceur

Annexe 6 : protocole permettant la réalisation de l'abaque pour la quantification des bactéries par cytométrie de flux

centrifugation du milieu Zobell et ensemencement culture 18 à 24h à 20°C

gamme de dilutions bactériennes 2.10^8 à 2.10^3 à partir de la suspension mère non centrifugée

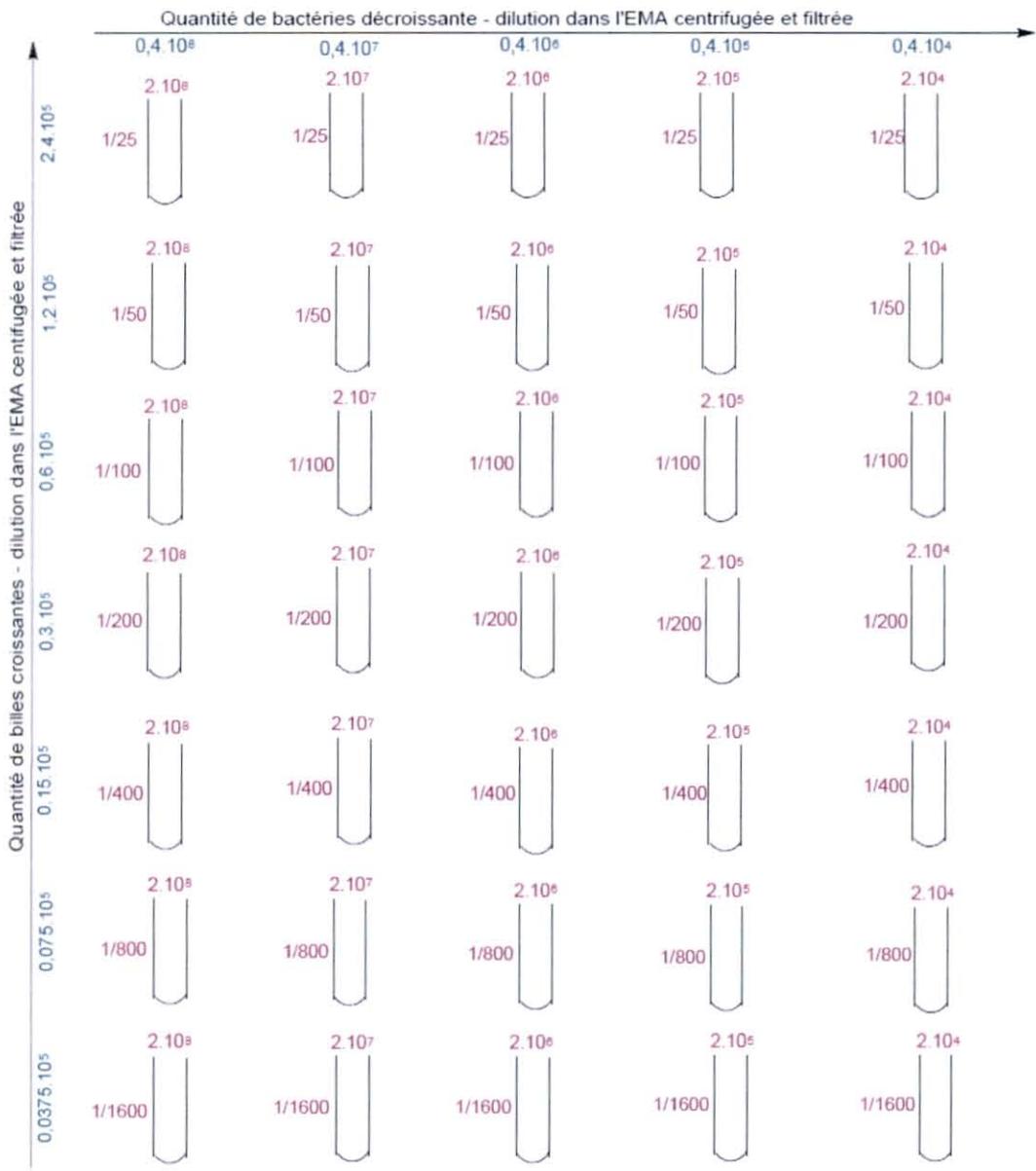
culture estimée à 2.10^8 : DO 1,4 à 1,6 à 600nm
vérification par étalement de 50µL de la dilution estimée 2.10^8

Pour chaque tube :

- 200µL de suspension bactérienne diluée
- 200µL d'EMA centrifugée et filtrée 0.2µm
- 100µL de solution de billes diluées et soniquées

gamme de dilution de billes 4µm de 1/25 à 1/1600

dilution utilisées
concentration réelle dans le tube



passage au cytomètre et relevé des pourcentages de billes - proto : pathbsyto, 50 000 evenements, 300s.

Annexe 7 : tableau de résultats de l'expérimentation d'épuration

1^{ère} expérimentation

Prélèvement		D0
Site	Résultats bactério dil 1/10	Résultats bactério dil 1/1000
A	0	0
A	0	0
A	1 (1)	0
A	0	0
B	0	0
B	0	0
B	0	0
B	2 (1)	0
B	0	0
B	17 (1 ou 2)	0
B	1 (1)	0

D7	
Site	Résultats bactério dil 1/10
Ronce	0
Seudre	0
Ronce	0
Seudre	0
Ronce	0
Ronce	0
Seudre	0
Ronce	0

2^{ème} expérimentation

eau d'élevage

1,20E+03

D 0

huître	date	comptage
1	16-mai	1,00E+03
2	16-mai	6,00E+03
3	16-mai	4,80E+03
4	16-mai	4,20E+03
5	16-mai	4,20E+04
6	16-mai	8,00E+02
7	16-mai	1,00E+04
8	16-mai	4,60E+03
moyenne		9,18E+03

D 7 jours

huître	date	comptage
10		6,00E+02
11		1,00E+02
12		3,00E+03
13		7,00E+02
14		1,00E+03
15		8,00E+02
16		8,00E+02
17		1,00E+03
moyenne		1,00E+03

Annexe 8 : tableaux de résultat des expérimentations de mise en contact des Vibrio avec l'hémolymphe d'huître

1^{ère} expérimentation (mars)

temps de contact (min)	%b	%H	% billes		
			4µm	%b fluo	%H fluo
témoin TR32	98,4	1,7	1,3	97,3	
témoin hémolymphe	77,8	22,3	7,1	0,2	18,6
0	82,6	17,5	4,3	30,2	24,9
5	84,7	15,3	3,9	38,8	27,2
10	83	17	4,8	39,2	27,9
15	84,8	15,3	4,7	40,8	31,3
20	85,1	14,9	4,2	38,6	29,6
30	87,9	12,1	3,7	46,7	38,5
45	88	12	2,8	53,8	52
60	86,3	13,7	2,7	48,3	52,4
90	96,8	3,2	1,3	70,1	39,1

2^{ème} expérimentation (juin)

rapport V/H temps de contact (h)	H seule					1				
	B%	Bfluo%	H	H fluo %	B4%	B%	Bfluo%	H	H fluo %	B4%
0,00	64,8	0,6	23,5	16,9	11,6	65,5	1,9	23,6	17,8	10,8
0,25	67,1	0,4	22,1	18,1	10,7	65,3	1,7	22,5	2	12
0,50	67	0,3	22,5	14,4	10,4	66,6	2,2	21,6	16,6	11,8
0,75	68	0,4	21,4	14,4	10,6	68,1	3,3	20,3	15,9	11,5
1,00	68,4	0,5	20,9	14,2	10,6	66,1	2,9	22,1	13,9	11,7
1,25	67,9	0,5	21,4	12,5	10,6	72,6	18,7	17,1	16,3	10,2
1,50	67,2	0,4	21,3	12,9	11,4	69,6	13,2	19	14,5	11,3
2,00	69,6	0,6	19,7	12,2	10,7	75,9	31,5	16,2	17,4	7,8
3,50	71,2	0,5	18,5	12,5	10,4	71,9	8,8	17,9	18,9	10,2
5,00	63,9	0,6	24,5	14,7	11,7	66,1	19,2	20,6	32,9	13,3
	10					100				
	B%	Bfluo%	H	H fluo %	B4%	B%	Bfluo%	H	H fluo %	B4%
	65,9	0,5	23,7	17	10,3	66	12,3	23,1	24,5	10,8
	67	0,6	22,4	16,8	10,6	67,4	13,5	21,6	26	10,9
	66,8	0,7	21,9	16,2	11,2	68,5	15	20,6	26,3	10,8
	67,1	0,8	21,4	15,9	11,5	69,2	17,3	20,2	26,1	10,4
	60,9	0,8	24,2	12,7	14,7	60,2	11,5	24,9	21,4	14,8
	69,3	1,8	19,2	13,3	11,4	71,5	21,3	18,1	27	10,4
	67,5	2	21,5	12,9	11	67,3	14,3	21,1	26,7	11,5
	71,1	8,2	19,5	12,5	8,8	71,1	17,3	19,4	31,5	9,5
	75,4	18,5	15,3	12,3	9,3	68,9	15,2	20,7	37,5	10,4
	72,8	18,4	16,5	20,4	10,8	68,1	16,2	18,4	37,4	13,5
	V. tasmaniensis 100									
	B%	Bfluo%	H	H fluo %	B4%					
	71	0,5	19,9	17,4	9					
	75,7	0,4	16,1	17,1	8,2					
	79,7	0,3	13,2	16,2	7					
	83,3	0,3	10,9	15,9	5,7					
	81,1	0,3	11,8	16,2	7,1					
	79,1	0,4	13,2	15,5	7,7					
	72,2	0,4	17,5	16,8	10,3					
	75,4	0,5	16	17	8,6					
	73,2	0,6	14,7	17,5	13,1					
	69,9	0,6	16,6	22,3	13,5					

3^{ème} expérimentation (juin)

rapport V/H

temps de contact (h)

	H					H 1 / 1 TR32				
	B%	Bfluo%	H	H fluo %	B4%	B%	Bfluo%	H	H fluo %	B4%
0,0	85,7	3,4	8,4	15,6	6	86	3,2	8,5	13,5	5,6
0,3	86,4	1,6	8	15,1	5,6	86	1,6	7,8	14,4	6,2
0,5	85,7	0,9	8,2	15,2	6,1	87	1,2	6,9	13,7	6,2
0,9	85,2	0,7	7,9	15,6	6,8	86,3	0,9	7,8	14,3	5,8
1,2	88,4	0,5	6,3	15,6	5,3	87,5	1	6,9	19	5,6
1,5	88,6	0,6	6,8	15,2	4,7	86,5	1,6	6,7	19,4	6,7
2,2	86,3	0,5	6,5	15,3	7,2	86,8	4,5	7,2	17,8	6,1
2,5	86,8	0,6	7,2	15,2	5,9	86,4	7	6,9	20,3	6,7
3,3	87,5	0,4	5,9	15,6	4,7	86,8	9,3	7,2	24,7	6
4,0	85,1	0,5	8,3	15,6	6,7	86,9	9,1	7,7	25,4	5,4

H 1 / 10 TR32					H 1 / 100 TR32				
B%	Bfluo%	H	H fluo %	B4%	B%	Bfluo%	H	H fluo %	B4%
85,9	3,5	8,6	14	5,5	85,8	11,2	8,2	16,6	6
86,1	2,2	8	13,9	5,9	86,2	11,1	7,3	20,4	6,5
86,9	1,8	7,2	13,7	5,9	86,3	11,2	7,3	23,1	6,4
86,7	1,7	7,1	15,4	6,3	86,4	11	6,8	25,2	6,7
87,5	2,1	6,8	18,8	5,6	87,8	12,8	6,9	35,9	5,3
88,4	4,8	6,6	23,1	5	87,9	16,8	6,8	44,5	5,2
87	11,4	7,1	25	5,8	86	15,6	7,3	43,6	6,7
86,8	10,1	7,2	23,4	6,1	86,3	13,9	6,1	41,8	7,5
84,4	4	6,9	27,1	6,7	83,2	13,5	7,6	44,8	9,2
86,7	7,8	7,5	28,5	5,7	75	22,4	14,7	54	10,2

H 1 / 100 V tasma				
B%	Bfluo%	H	H fluo %	B4%
86	2	7,8	11,7	6,2
86,4	1,1	7,5	11,5	6,1
87,6	0,7	7,1	12,9	5,4
87,1	0,6	6,4	12,2	6,4
88,6	0,5	6,3	16,5	5,1
87,6	0,6	6,8	17,8	5,6
82,2	0,9	9,5	19,4	8,2
80,9	0,9	8,8	18,4	10,3
82,1	0,8	9,5	20,5	8,4
82,2	0,9	8,5	17,6	9,2

Annexe 9 : tableau de suivi d'une infection expérimentale d'huître avec TR32

huître	date	heure	statut	fichier cyto	%B	%B fluo	%H	%H fluo	comptage (UFC/mL)
1	29-mai	17h	vivante non infecté	pat00028	62,8	1,4	37,2	5,1	pur : 0
2	29-mai	17h	vivante non infecté	pat00025	64,2	0,8	35,8	3	
3	29-mai	17h	vivante non infecté	pat00026	89,5	0,2	10,6	1,6	
4	30-mai	9h30	vivante	pat00033	70,3	76	29,8	93,7	5,00E+04
5	30-mai	9h30	vivante	pat00034	84,4	46	15,7	46,6	8,00E+04
6	30-mai	17h	vivante	pat00049	86,5	21,4	13,7	14,9	1,50E+04
7	30-mai	17h	vivante	pat00052	93,6	18,5	6,5	4,6	3,00E+04
8	30-mai	17h	morte	pat00053	79,9	48,6	20,3	38,2	2,00E+04
9	31-mai	9h30	vivante	pat00063	50,3	11,1	49,7	33,6	0,00E+00
10	31-mai	9h30	moribonde	pat00064	85,4	1	14,7	3,8	4,00E+03
11	31-mai	19h30	vivante	pat00152	86	0,7	14,1	2	1,60E+03
12	31-mai	19h30	vivante	pat00153	82	0,9	18,1	2	0
13	31-mai	19h30	morte	pat00154	88,6	4,6	11,4	5,7	1,60E+03
14	01-juin	10h00	vivante	pat00155	90,3	0,5	10	2,6	1,30E+04
15	01-juin	10h00	vivante	pat00156	92,9	0,1	7,1	3,4	1,00E+03
16	02-juin	11h00	vivante	pat00164	73,2	1,1	26,9	2,7	1,50E+04
17	02-juin	11h00	vivante	pat00163	70,8	1,8	29,3	3,5	0
18	02-juin	11h00	morte	pat00165	84,6	0,9	16	1,3	7,40E+04
19	02-juin	11h00	morte	pat00166	81,3	2,4	18,8	2,9	4,00E+05
20	04-juin	16h	vivante	pat00167	85,9	0,3	14,3	0,6	0
21	04-juin	16h	vivante	pat00168	71	0,5	29	4,9	0
22	04-juin	16h	vivante	pat00169	88,2	0,4	12,1	3	0
23	04-juin	16h	moribonde	pat00170	72,6	0,5	27,5	1,4	20
24	04-juin	16h	moribonde	pat00171	81,8	0,4	18,3	1	10
25	04-juin	16h	morte	pat00172	76,6	1	23,6	2,3	60
26	04-juin	16h	témoin EMA	pat00173	79,4	0,3	20,6	3,2	0
27	04-juin	16h	témoin EMA	pat00174	75,3	0,2	24,8	1,6	0
28	04-juin	16h	témoin EMA	pat00175	70,4	0,2	29,7	1,1	0

Annexe 10 : tableau récapitulatif des prélèvements effectués lors de l'épisode de mortalité rencontré lors de ce stage dans les installations du LGP

souche	type d'huître	statut de l'huître	comptage *100	extraction	Résultats PCR gyrB n°1	Résultats PCR gyrB n°2	identification 16S 19-06-07
S11	familles génétiques	morte	7	papier FTA	-	-	
S12	familles génétiques	morte	>100	papier FTA	+	+	<i>V. aestuarianus</i>
S13	familles génétiques	morte	>>500	papier FTA	+	+	<i>V. aestuarianus</i>
S14	familles génétiques	morte	>>500	papier FTA	+	+	<i>V. aestuarianus</i>
S15	familles génétiques	moribonde	>>500	papier FTA	+	++	<i>V. aestuarianus</i>
S16	familles génétiques	moribonde	>>500	papier FTA	+	-	<i>V. aestuarianus</i>
S17	familles génétiques	moribonde	163	papier FTA	-	-	
S18	familles génétiques	moribonde	163	papier FTA	-	-	<i>pseudoalteromonas haloplanktis</i>
S19	familles génétiques	moribonde	163	papier FTA	-	+	
S20	familles génétiques	moribonde	163	papier FTA	-	?	<i>V. splendidus</i>
S21	familles génétiques	morte	>>500	papier FTA	+	?	<i>V. aestuarianus</i>
S22	familles génétiques	morte	>>200	papier FTA	+	?	<i>V. aestuarianus</i>
S23	familles génétiques	morte	>>200	papier FTA	?	?	<i>V. splendidus</i>
S24	familles génétiques	morte	>>200	papier FTA	+	+	<i>V. aestuarianus</i>
S25	familles génétiques	morte	40(2)	papier FTA	-	-	<i>pseudoalteromonas haloplanktis</i>
S26	familles génétiques	vivante	1(1)	papier FTA	-	++	<i>colwellia aestuarii</i>
S27	familles génétiques	morte	>>200	papier FTA	-	+	
S28	familles génétiques	morte	>>500	papier FTA	+	++	<i>V. aestuarianus</i>
S29	familles génétiques	morte	>>500	papier FTA	+	++	<i>V. aestuarianus</i>
S30	familles génétiques	morte	>>500	papier FTA	-	++	<i>V. splendidus</i>
S31	familles génétiques	morte	>>500	papier FTA	+	++	
S32	familles génétiques	morte	>>200	papier FTA	+	++	<i>V. aestuarianus</i>
S33	familles génétiques	morte	>>200	papier FTA	+	++	<i>V. aestuarianus</i>
S34	familles génétiques	vivante	30(3)	papier FTA	-	+	
S35	Producteur	vivante	>>300	colonies bouillies	NR	++	
S36	Producteur	vivante	>>300	colonies bouillies	NR	++	
S37	Producteur	moribonde	>1000	colonies bouillies	NR	++	
S38	Producteur	moribonde	>1000	colonies bouillies	NR	++	