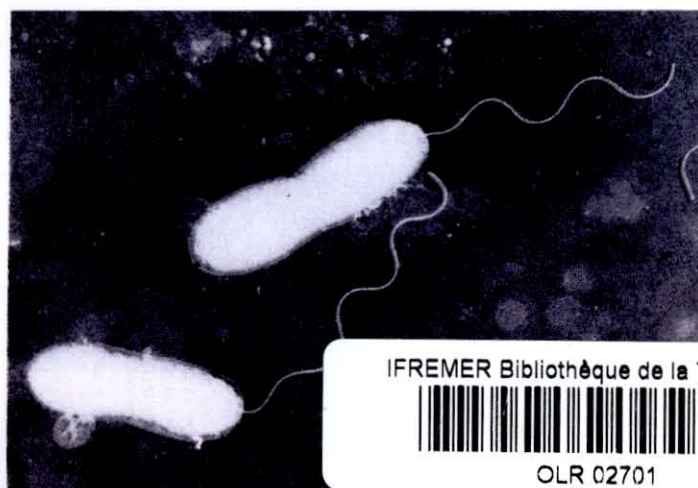


Mémoire présenté par Emmanuel JAFFRÈS
sous la direction du Docteur Denis SAULNIER

**Structuration génétique d'une collection de souches
de Vibrio. Contribution à la mise au point d'outils
de typage moléculaire pour l'aide au diagnostic.**



Mémoire présenté pour l'obtention du :

MASTER 2 Recherche Mention Biochimie
Spécialité Biochimie, Biologie cellulaire et moléculaire,
Chimie Bio-organique
Université de La Rochelle.
UFR Sciences Fondamentales et Sciences pour l'Ingénieur.

2004-2005

TABLE DES MATIERES

Introduction.....	1
--------------------------	----------

PREMIER CHAPITRE : DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

I - L'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	2
I.1 – Description	2
I.2 – Anatomie	3
I.2.1 - La Coquille	3
I.2.2 - Manteau et cavité palléale	3
I.2.3 - Masse viscérale	3
I.3 – Reproduction	4
I.4 – Ostréiculture	4
I.5 - Mortalités estivales	5
II - Le genre bactérien <i>Vibrio</i>	7
II.1 – Description	7
II.2 – Taxonomie des vibrios	7
III - Contexte scientifique, problématique et objectif du stage	9

DEUXIÈME CHAPITRE : MATERIELS ET METHODES

I - Souches bactériennes	13
II - Extraction d'ADN	13
II .1 - Protocole classique au phénol-chloroforme	14
II.1.1 - Extraction de l'ADN par séparation de la phase protéique	14
II.1.2 - Précipitation des acides nucléiques	14
II.1.3 - Conservation de l'ADN	14
II .2 - Protocole avec le réactif d'extraction <i>VIAGEN-Biotech</i>®	15

III – Amplification d’ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	15
III . 1 – Préparation d’une réaction de PCR.....	15
III . 2 – Visualisation des amplicons	16
IV – Typage moléculaire des souches bactériennes	16
IV . 1 – Analyse RFLP	17
IV . 1.1 – Principe	17
IV . 1.2 – Technique	17
IV . 2 – Séquençage des produits PCR et alignement de séquences	17
IV . 2.1 – Purification des produits PCR	17
IV . 2.2 – Réaction de séquence	18
IV . 2.3 – Précipitation de la réaction de séquençage	19
IV . 2.4 – Obtention et traitement des séquences	19
IV . 3 –Macroarray	20
IV . 3.1 – Principe	20
IV . 3.2 – Séquence des oligonucléotides déposés sur la membrane	20
IV . 3.3 – Marquage de l’échantillon d’ADN provenant de la souche	20
IV . 3.4 – Conception des membranes de nylon	21
IV . 3.5 – Pré-hybridation et hybridation	21
IV . 3.6 – Lavage et immunorévélation des membranes	21
V – Infections expérimentales	23

TROISIÈME CHAPITRE : RÉSULTATS

I - Structuration génétique de souches de Vibrios et étude de pathogénécité	24
I.1 – Profilage des souches par PCR-RFLP/Gyr-B/HhaI	24
I .1.1 – Profils RFLP/Gyr-B/HhaI des souches types	24
I .1. 2 – Profils RFLP/Gyr-B/HhaI des souches étudiées	25
I .1. 3 – Analyse comparative des Profils des souches étudiées avec ceux des souches types	25
I.2 – Séquençage et alignement de séquences	27

I .2.1 – Séquençage de l'ADNr 16S	28
I .2.2 – Séquençage du gène <i>gyrB</i>	29
A – Sélection des souches à étudier en séquençage du gène <i>gyrB</i>	29
B - comparaison de la typologie <i>gyrB</i> sens, <i>gyrB</i> total	30
C - Arbre phylogénétique du gène <i>gyrB</i>	31
I . 3 – Pouvoir pathogène des souches.....	32
II – Mise au point des macroarrays	32
II .1 –choix d'une technique de détection	32
II .2 –Mesure de sensibilité des macroarrays	33
II .3 –Essai de spécificité des macroarrays	35
 QUATRIÈME CHAPITRE : Discussion, conclusion générale et perspectives.....	 37

Introduction

La production de l'huître creuse *Crassostrea gigas* représente depuis une dizaine d'années plus de 10 % de la production annuelle mondiale de poissons, crustacés et mollusques soit en valeur financière près de 3,5 milliards de dollars. Dès leur introduction dans les années 1970 sur le littoral Français, les populations de *C. gigas* ont subies des épisodes dits de mortalités estivales, qui affectent les jeunes huîtres élevées en milieu naturel sur estran ou en conditions artificielles en éclosérie. Ces mortalités estivales sont la résultante d'un ensemble d'événements impliquant des facteurs de l'environnement, de l'huître et l'intervention d'agents pathogènes.

Lors des épisodes de mortalités estivales des années 1990, deux types de pathogènes ont été identifiés : un virus de type herpès a été observé sur de nombreux lots subissant des mortalités, et deux bactéries appartenant au groupe polyphylétique de *Vibrio splendidus* ont été isolées d'huîtres subissant des épisodes de mortalités estivales. + *V. aestuarius*

L'étude du rôle des vibrios dans les mortalités de *C. gigas* est cependant confrontée à un problème majeur, qui est celui de leur identification en tant qu'espèce. En effet, pour les espèces proches de *V. splendidus*, les outils de taxonomie phénotypique classiques se révèlent insuffisants pour permettre leur spéciation. Le typage et la phylogénie moléculaire en se basant sur l'étude de gènes particulier comme l'ADNr-16S ou encore le gène *gyrB*, semblent être des outils alternatifs particulièrement pertinents pour y parvenir. Par cette approche, un certain nombre d'espèces ont pu alors être décrites, et positionnées dans l'arbre phylogénétique des Vibrios au sein du groupe des espèces apparentées à *V. splendidus*. C'est le cas des espèces *V. lentus*, *V. chagasii*, *V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis*, *V. cyclitrophicus*, *V. crassostreae* et *V. gigantis*.

Toutefois, il persiste toujours des incertitudes concernant le positionnement sur cette arbre de quelques unes de ces espèces (cas des espèces *V. lentus*, *V. kanaloae*, *V. pomeroyi* et *V. tasmaniensis*).

Le présent travail a consisté à clarifier la taxonomie des espèces de Vibrios apparentées à *V. splendidus*, par augmentation de la résolution de l'arbre phylogénétique. Pour atteindre cet objectif la structuration génétique d'une collection de souches de Vibrios en ayant recours à plusieurs techniques de typage moléculaire a été réalisée. Profitant de l'opportunité de ce travail sur la phylogénie des Vibrios, de nouveaux outils d'identification moléculaire basée sur le principe des puces à ADN ont été mis au point : les Macroarrays.

PREMIER CHAPITRE
DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

I - L'huître creuse *Crassostrea gigas* :

I.1 – Description :

L'huître creuse *Crassostrea gigas* est originaire d'Asie. Elle a été introduite sur les côtes des continents américain, océanien et européen au cours du XX^{ème} siècle. A ce jour, elle est cultivée dans 27 pays et sa production est évaluée à plus de 4,2 millions de tonnes en 2003, ce qui représente une grande majorité de la production conchylicole mondiale. Ce sont des animaux métazoaires (organisme pluricellulaire), triploblastiques (possédant entre l'ectoderme et l'endoderme un troisième feuillet individualisé, le mésoderme), coelomates (possédant un coelome), protostomiens (dont la bouche embryonnaire donne la bouche adulte), hyponeuriens (système nerveux ventral) à symétrie bilatérale. Leur corps est mou, non segmenté. Selon Grassé (1960), la classification complète à laquelle appartient l'huître creuse est la suivante :

- (1) Embranchement : *Mollusques*
- (2) Classe : *Bivalves – Lamellibranches*
- (3) Ordre : *Filibranchia*
- (4) Sous-Ordre : *Anisomyaria*
- (5) Super-Famille : *Ostreoidea*
- (6) Famille : *Ostreidae*
- (7) Genre : *Crassostrea*
- (8) Espèce : *gigas*

(1) Un mollusque est un animal à corps mou avec ou sans coquille.

(2) Un bivalve est défini comme étant un mollusque aquatique à symétrie bilatérale en général, à corps protégé par deux valves presque toujours externes reliées dorsalement par un ligament élastique qui tend à les écarter, et souvent engrenées par des dents constituant une charnière. La fermeture des valves est assurée par deux muscles adducteurs qui les relient l'une à l'autre et dont l'antérieur peut s'atrophier ou disparaître.

(3) Un filibranche possède des branchies formées chacune de deux lames comportant des filaments réfléchis à jonctions ciliaires, conjonctives ou parfois vasculaires.

(4) Le sous ordre des *Anisomyaria* présente comme particularité un muscle adducteur antérieur absent ou plus petit que le postérieur. Les dents sont aussi absentes ou remplacées par de petits denticules.

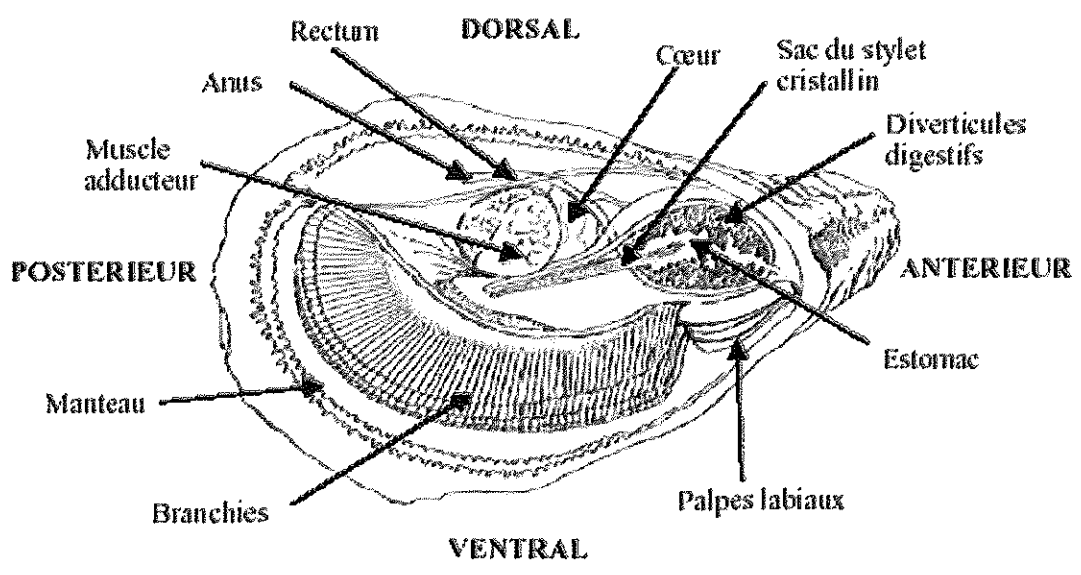


Figure 1. Anatomie de l'huître creuse *Crassostrea gigas* d'après Howard & Smith (1983).

(5) Les *Ostreoidea* sont caractérisés par une coquille inéquivalve irrégulière, à valve gauche fixée. Le cartilage ligamentaire est logé dans une fossette triangulaire, et la charnière est édentulée.

(6) Les *Ostreidae* ont une valve gauche en général plus profonde que la droite avec des formes et des sculptures très variables, et les bords des valves sont assez plissés. La grande variabilité des huîtres ne permet guère d'utiliser les caractères de la coquille pour leur identification.

(7) Le genre *Crassostrea* indique que la larve a une prodissoconque inéquivalve à charnière munie de deux crénelures à chacune de ses extrémités et que le ligament est interne. Pour l'adulte, la coquille dissoconque est allongée et les dépôts crayeux sont feuilletés. La valve inférieure est subplissée ou plissée ce qui correspond à la valve creuse (équivalent à la valve gauche ou inférieure), alors que la valve supérieure est très rarement plissée.

I.2 – Anatomie :

I.2.1 - La Coquille. Voir Figure 1 page ci-contre :

Elle est formée de trois parties distinctes, de l'extérieur vers l'intérieur :

- le périostracum : membrane organique très mince et colorée.
- les couches prismatiques : prismes verticaux de carbonate de calcium (calcite) enrobés par une matrice protéique de conchyoline.
- la nacre : structure feuilletée constituée de cristaux d'aragonite.

I.2.2 - Manteau et cavité palléale :

Le manteau assure la genèse de la coquille. Il s'agit d'une formation tégumentaire qui adhère étroitement au corps dans les régions dorsales et latéro-dorsales, puis se dilate au niveau de la base des branchies en deux lobes minces très élargis qui délimitent la cavité palléale. Cette cavité contient l'anus, les orifices rénaux et génitaux et les branchies (ou cténidies). Les branchies sont constituées de deux paires de rangées longitudinales de filaments, et elles sont soudées au manteau à leur base. Elles constituent le principal organe de la respiration et servent également à la filtration et à la rétention des particules en suspension.

I.2.3 - Masse viscérale :

La masse viscérale renferme les organes de la digestion, de l'excrétion et de la reproduction. Dans la partie antérieure des branchies, deux paires de palpes labiaux

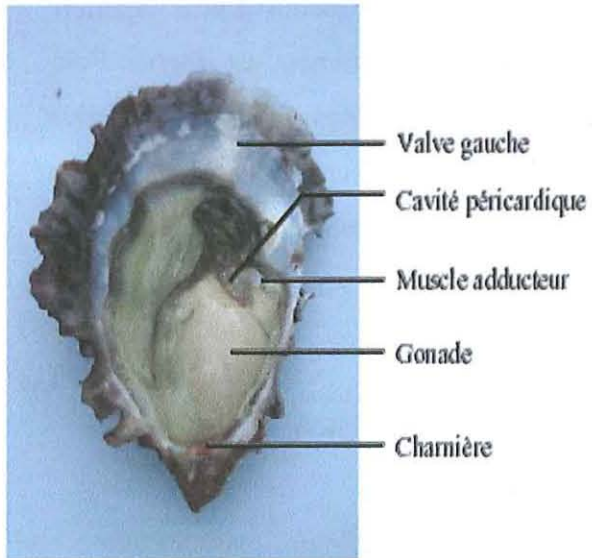


Figure 2 : Anatomie d'une huître en maturation.

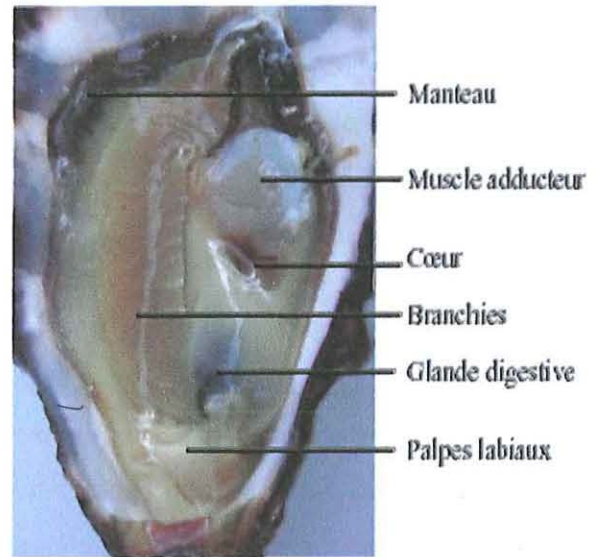


Figure 3 : Anatomie d'une huître non mature.

permettent le tri et l'orientation des nutriments vers la bouche. Un œsophage cilié très court donne sur un estomac contenant un stylet cristallin et dans lequel s'ouvre des conduits provenant de la glande digestive. L'intestin fait suite à l'estomac, et forme une large boucle pour se terminer par le rectum situé derrière le muscle adducteur. A proximité de ce muscle se trouve le cœur qui est situé dans une cavité péricardique. Il est formé de deux oreillettes et d'un ventricule, qui par des artères et des artérioles distribuent le sang aux différentes parties du corps. L'appareil circulatoire est dit de type lacunaire car le sang n'est plus canalisé à proximité des organes, et il circule dans des espaces libres dans le tissu conjonctif. Le système nerveux est formé de plusieurs paires de ganglions nerveux (cérébroïdes et viscéraux). En période de reproduction, la gonade se développe pour envelopper à maturité l'appareil digestif.

La Figure 2 page ci-contre représente l'anatomie d'une huître mature avec la gonade hypertrophiée, alors que la Figure 3 représente l'anatomie d'une huître hors période de maturation.

I.3 – Reproduction :

Les huîtres adultes présentent une reproduction sexuée. Les géniteurs produisent donc des gamètes mâles (spermatozoïdes) ou femelles (ovocytes). Chez *Crassostrea gigas*, la sexualité est alternative, l'huître fonctionne donc comme mâle ou femelle au cours d'une saison et peut changer ou non de sexe l'année suivante. Cependant, quelques individus hermaphrodites peuvent être observés. Le milieu (température et nutrition), mais aussi des facteurs hormonaux internes, semblent contrôler le déterminisme du changement de sexe (Barnabé, 1985). La gamétogenèse débute dès que la température de l'eau s'élève au-dessus de 10°C. Les produits génitaux ne sont émis que 4 ou 5 mois plus tard, lorsque la température dépasse les 18°C. La fécondation a lieu à l'extérieur du corps de l'animal et l'huître creuse *C. gigas* est ovipare (Grelon, 1978).

I.4 – Ostréiculture :

La totalité ou la majorité du cycle d'élevage de l'huître creuse se déroule en milieu ouvert, les juvéniles d'huîtres provenant pour 90 % du captage naturel des larves sur le terrain et pour 10 % de la production de larves en éclosion (Robert & Gerard, 1999). Le captage consiste à disposer, au cours de l'été, des structures appelées collecteurs et destinées à servir de support de fixation pour les larves d'huîtres avant leur métamorphose. Six à dix-huit mois après la fixation, les huîtres sont détachées ("détroquées") de ces

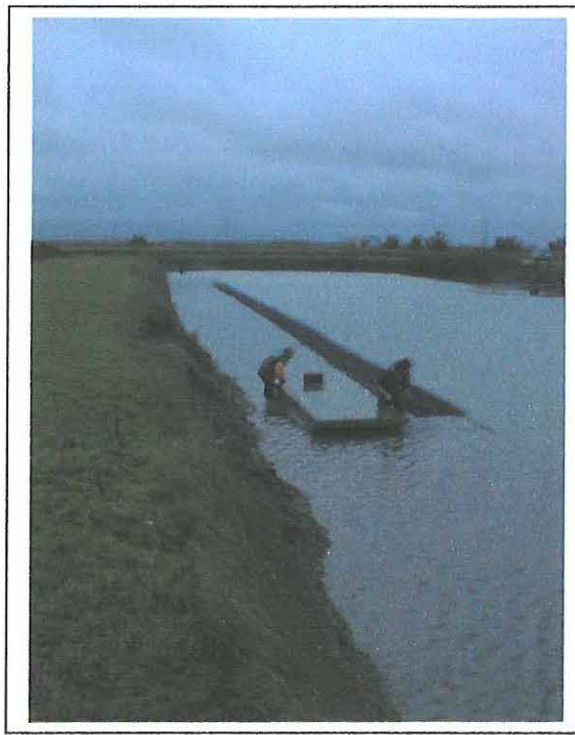


Figure 4 : Photo d'une claire ostréicole.

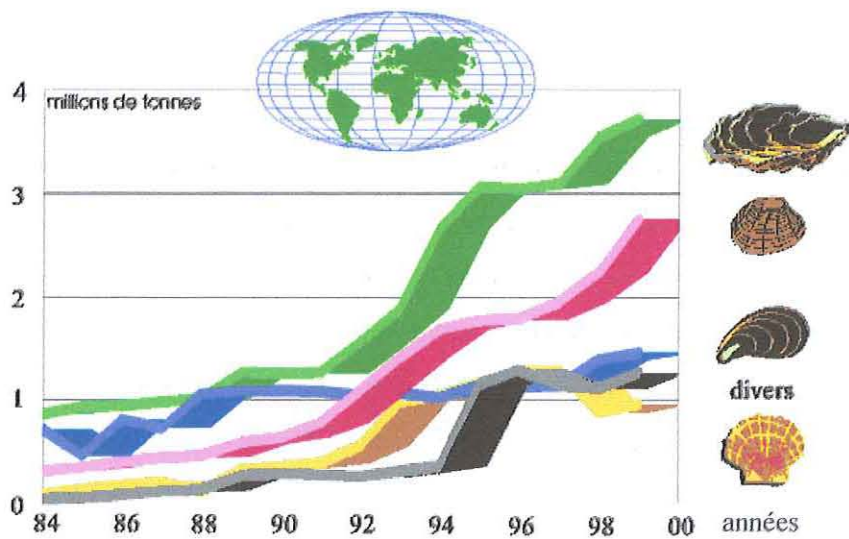


Figure 5 : Evolution de la production mondiale de mollusques.

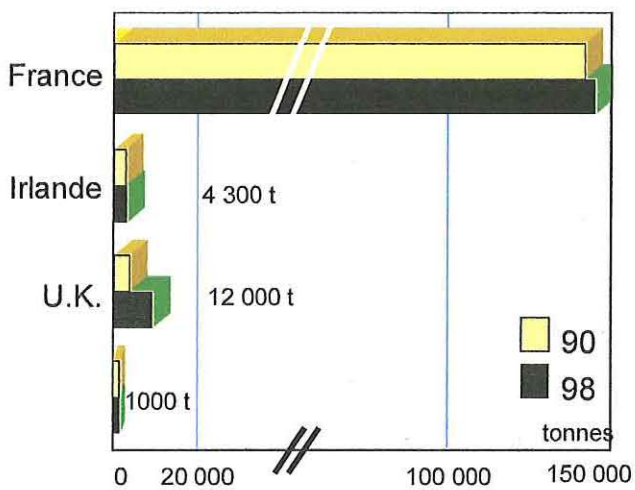


Figure 6 : Production Européenne d'huîtres.

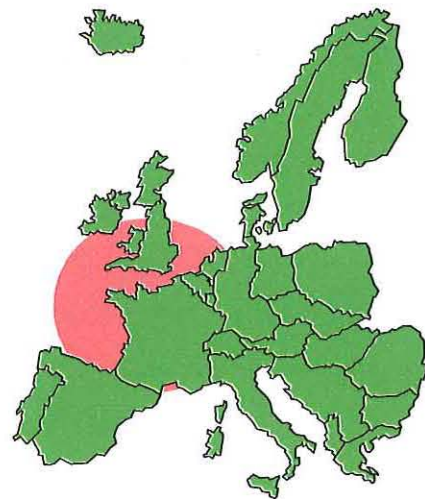


Figure 7 : Répartition géographique de la production d'huîtres.

supports. Le reste de l'élevage s'effectue soit en poches grillagées posées sur des tables métalliques, soit "semées" sur des terrains pour l'élevage à plat, soit collées à des cordes pour l'élevage en suspension (Méditerranée). Dans certains cas, une fois l'âge adulte atteint, les huîtres sont affinées en claires (voir Figure 4 page ci-contre) avant commercialisation, la durée d'élevage et les densités dans ces claires correspondant à différentes appellations (Fines de claires, Spéciales de claires et Pousse en claire).

Avec plus de 3.5 millions de tonnes, les huîtres représentent plus du tiers de la production mondiale de mollusques en 2000. La France est le principal producteur d'huîtres en Europe. L'huître creuse, *Crassostrea gigas*, équivaut à 98 % de la production ostréicole française (huîtres creuses et plates : 150 000 T/an). Voir Figures 5,6 et 7 page ci-contre.

I.5 - Mortalités estivales :

Depuis 1940, des épisodes de mortalité anormale de *C. gigas* en période estivale sont observés au Japon (Imai et al., 1965), aux Etats-Unis (Glude, 1975 ; Cheney et al., 2000) et en Europe (Gouletquer et al., 1998). En France, de tels épisodes sont apparus dès l'introduction de cette espèce au début des années 1970 (Maurer & Comps, 1986). Ces épisodes, dits de mortalités estivales, présentent des taux de mortalité très variables aux niveaux temporel et spatial. En effet, les variations inter-annuelles peuvent être très fortes et des lots très proches les uns des autres peuvent subir des taux de mortalité allant de quelques % à plus de 60 %. Les causes exactes de ces phénomènes ne sont généralement pas déterminées et une étiologie plurifactorielle est souvent suspectée. Les mortalités estivales sont la résultante d'un ensemble d'événements impliquant des facteurs de l'environnement, de l'huître et l'intervention d'agents pathogènes, sachant qu'il est possible que différents ensembles d'événements soient regroupés sous le terme "mortalités estivales". A ce jour, certains facteurs sont décrits dans la littérature comme intervenant au moins dans certains épisodes de mortalités estivales.

1- Le facteur environnemental le plus fréquemment cité est une température supérieure à 19-20°C. Des températures élevées induisent un stress pour les huîtres et peuvent également avoir pour conséquences des blooms phytoplanctoniques, des proliférations de pathogènes, une hypoxie du milieu, une augmentation de la salinité ainsi que des modifications physiologiques (Imai et al., 1965 ; Glude, 1975 ; Gouletquer et al., 1998 ; Cheney et al., 2000).

2- L'état physiologique des huîtres est fortement lié aux conditions environnementales. Au printemps, l'augmentation de la température et de la quantité d'alimentation disponible

entraînent une forte augmentation de croissance et le développement de la gamétogénèse. La majorité des ressources énergétiques acquises étant alors destinée à la reproduction, l'huître présente un bilan énergétique déficitaire en phase de maturation avancée (Soletchnik et al., 1997).

3- Un déterminisme génétique semble également intervenir dans ces mortalités. Aux Etats-Unis, des familles issues de parents sélectionnés pour leur résistance accrue aux phénomènes de mortalités estivales présentent une amélioration des taux de survie (Beattie et al., 1980).

4- Les pratiques culturales peuvent également influencer les taux de mortalité. Dans le bassin de Marennes Oléron, les huîtres élevées à plat sur le sédiment présentent des taux de mortalité supérieurs à celles élevées en poches sur des tables ostréicoles (Gouletquer et al., 1998 ; Soletchnik et al., 1999).

5- L'intervention d'agents pathogènes a été suspectée lors de plusieurs épisodes, cependant, à ce jour, un seul et même agent infectieux n'est pas identifié comme seule cause de ces mortalités. Un parasite du genre *Hexamita*, protozoaire flagellé, a été associé à un épisode de mortalités estivales en Alaska (taux de mortalité > 50 %) (Meyers et al., 1990). Au vu des conditions climatiques et physiologiques, les auteurs ont conclu à une infection secondaire et au caractère opportuniste de ces protozoaires. Au cours des épisodes de mortalités estivales des années 1960 au Japon, une bactérie Gram positive a été observée (Imai et al., 1965), mais les auteurs ont suggéré une action uniquement opportuniste. En 1987, aux Etats-Unis, Elston et al. (1987) ont décrit une "bactériémie inflammatoire fatale" associée à la présence de nodules et de zones décolorées sur le manteau, les branchies et le muscle adducteur et ont rapproché ces symptômes de ceux décrits par Imai et al. En 1965, Friedman et Hedrick (1991) ont observé des symptômes identiques et les ont associés à la présence d'une bactérie actinomycète, *Nocardia crassostrea* (Friedman et al., 1998). Ces auteurs ont conclu qu'au moins une partie des épisodes de mortalités estivales aux Etats-Unis était due à cet agent pathogène. En France, lors des épisodes de mortalités estivales des années 1990, deux types de pathogènes ont été identifiés : 1) un virus de type herpès a été observé sur de nombreux lots subissant des mortalités (Renault et al., 1994 ; Renault et al., 1995) ; 2) deux bactéries appartenant au groupe polyphylétique de *Vibrio splendidus* ont été isolées d'huîtres subissant des épisodes de mortalités estivales et ont induit des mortalités en infections expérimentales (Lacoste et al., 2001a ; Waechter et al., 2002). Cependant, Le Roux et al. (2002) ont analysé une collection de souches phénotypiquement apparentées à *Vibrio splendidus* et isolées d'huîtres subissant des épisodes de mortalités

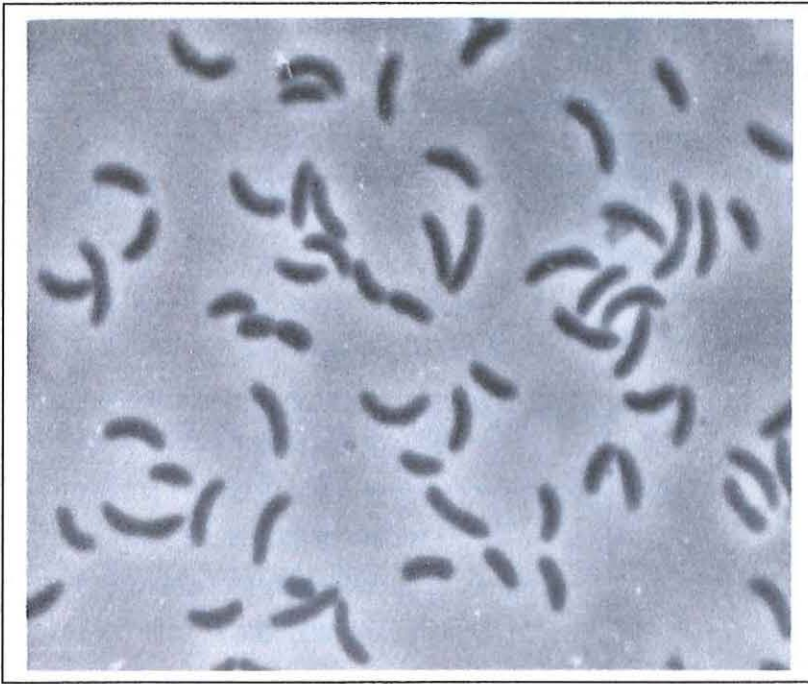


Figure 8 : Phase contrast micrograph of *Vibrio splendidus* biovar II in exponential phase of growth in YEB ($\times 3\ 000$).

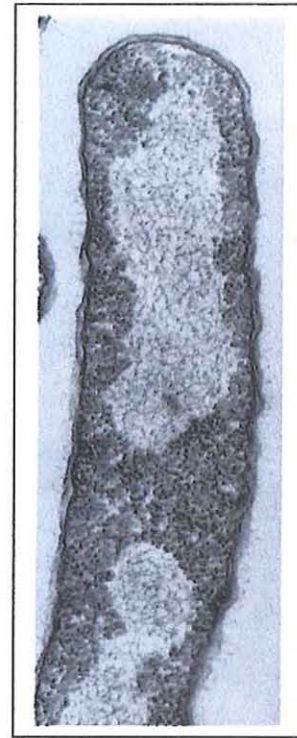


Figure 9 : Ultrathin section of *Vibrio harveyi* in exponential phase of growth in YEB ($\times 43\ 000$).

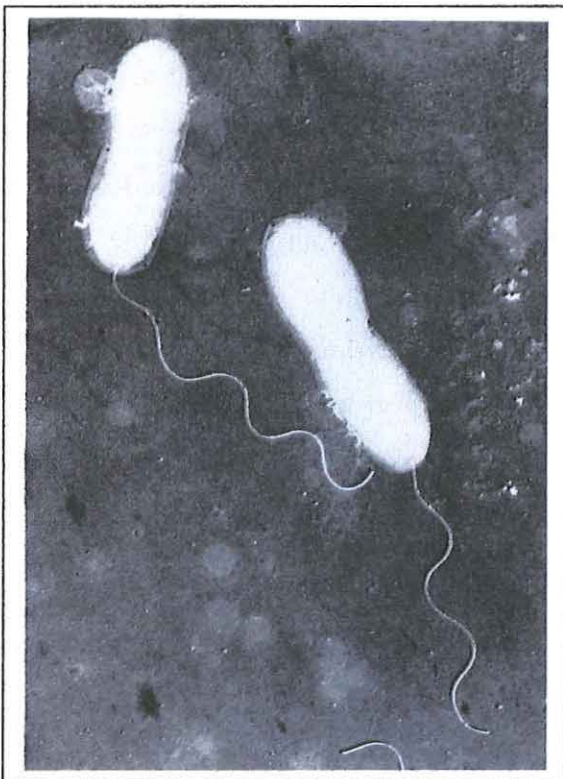


Figure 10 : Electron micrograph of *Vibrio alginolyticus* grown in liquid medium showing the sheathed polar flagellum. Shaded preparation ($\times 13\ 000$)

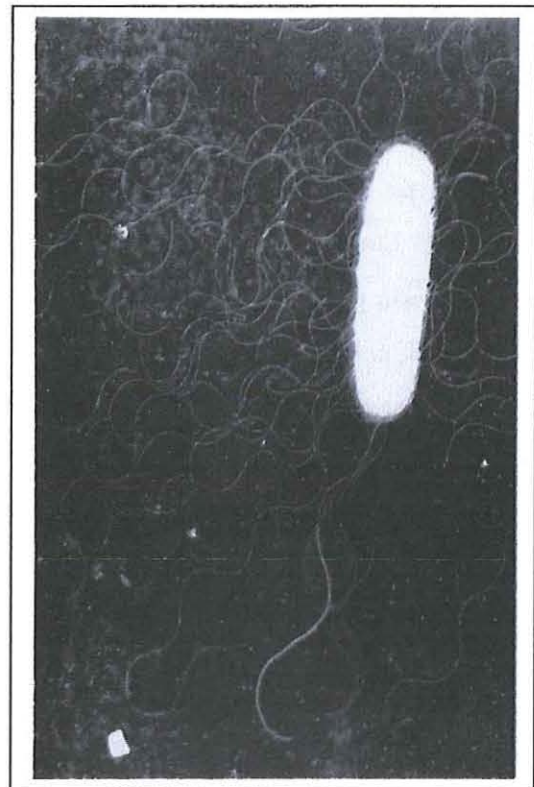


Figure 11 : Electron micrograph of *Vibrio alginolyticus* grown on solid medium showing the thick, sheathed polar flagellum and the numerous unsheathed lateral flagella.. Shaded preparation ($\times 18\ 000$)

estivales. Le résultat de cette étude épidémiologique montre que si des souches de *Vibrio* sont impliquées dans les phénomènes de mortalités estivales, il ne s'agit pas d'une souche ou d'une espèce unique. En 2001, l'IFREMER a initié un programme pluridisciplinaire sur l'étude des mortalités estivales de l'huître creuse *C. gigas* (acronyme MOREST). Ce programme implique des équipes de généticiens, physiologistes, immunologistes, écophysiologistes, écotoxicologues et pathologistes. Il vise à caractériser les facteurs étiologiques des mortalités estivales par des études sur le terrain et en laboratoire et à proposer des solutions préventives.

II - Le genre bactérien Vibrio :

II.1 – Description. Voir Figure 8, 9, 10 et 11 page ci-contre :

Les bactéries du genre *Vibrio* appartiennent à la famille des *Vibrionaceae*, classe des γ -Protéobactéries. Ce sont des bacilles Gram négatif, droits ou incurvés, majoritairement mobiles grâce à la présence d'un ou plusieurs flagelles. Les vibrions sont chimio-organotrophes, aérobies-anaérobies facultatifs et possèdent un métabolisme respiratoire et fermentatif ainsi que, pour la plupart des espèces, une oxydase. Ce sont des bactéries halophiles, isolées d'environnements aquatiques et généralement capables de croître sur milieu TCBS (Thiosulfate citrate bile saccharose). La composition en bases G-C de leur ADN est de l'ordre de 38-51 mol% (Baumann et al., 1980 ; Baumann & Schubert, 1984). Une série de techniques phénotypiques et/ou génotypiques sont actuellement disponibles pour identifier et/ou typer les souches appartenant à ce genre.

II.2 – Taxonomie des vibrions :

Les genres *Vibrio* et *Photobacterium*, les plus importants taxons de la famille des *Vibrionaceae*, font partie des genres bactériens les plus anciennement décrits.

La première description d'un vibrio, *V. cholerae*, l'agent responsable du choléra chez l'homme, a été faite par le physicien italien Filippo Pacini en 1854. Jusqu'à la moitié du 20^{ème} siècle, l'identification des vibrions est basée sur quelques descriptions phénotypiques: morphologie (flagelle, courbure de la cellule) croissance dans certains milieux de culture. Au début des années 90, un certain nombre de tests phénotypiques et une analyse en taxonomie numérique permettent de mieux identifier les bactéries appartenant à ce genre (Bauman *et al.*, 1980, Alsina et Blanch, 1994). D'une manière schématique, la méthode numérique consiste à étudier pour chaque souche, plus d'une centaine de caractères morphologiques, biochimiques, culturels, structuraux comme par exemple l'utilisation de

différents composés comme sources nutritives carbonées, la mise en évidence de certaines activités enzymatiques (arginine dihydrolase, lysine et orthinine décarboxylases, gélatinase, chitinase, oxydase, catalase,...), la tolérance au sel, la croissance à différentes températures, le profil antibiogramme et la composition en GC du génome. Le même poids est attribué à chacun des caractères qui sont codés 1 pour la présence du caractère et 0 pour son absence. Les isolats bactériens, notamment les souches types de chaque espèce bactérienne déjà décrite, sont ensuite regroupés selon le degré de parenté ce qui permet de proposer une affiliation taxonomique pour tout nouvel isolat bactérien d'intérêt. Cependant, même en multipliant le nombre de caractères étudiés (jusqu'à 300 tests dans certaines études), la taxonomie numérique évalue en première approximation moins de 10 % du potentiel génétique d'une bactérie sachant que le génome de *V. cholerae* est composé, à titre d'exemple, de 3828 gènes codant des protéines. De plus, cette approche se révèle inopérante pour certaines espèces de *Vibrio*, notamment celles apparentées à *V. splendidus*, du fait de l'absence d'un nombre suffisant de caractères biochimiques discriminants entre espèces proches d'un point de vue phylogénétique et de la variabilité de certains caractères observée pour des isolats appartenant pourtant à la même espèce sur la base des résultats d'hybridation ADN/ADN (Le Roux et al, 2005). Il n'en demeure pas moins que l'approche taxonomique classique basée sur la phénotypie demeure incontournable pour tout travail de description d'une nouvelle espèce car les souches doivent être facilement identifiées en accord avec les recommandations du "Committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics" (Wayne et al, 1987).

Depuis une vingtaine d'années, les approches moléculaires portant sur l'analyse de la totalité ou d'une infime partie de l'ADN génomique ont révolutionné la classification des procaryotes en permettant notamment l'étude taxonomique de bactéries non cultivables. Il s'agit notamment de déterminer la séquence nucléotidique partielle de gènes hautement conservés tels ceux codant l'ARN ribosomal. D'autres séquences d'intérêt phylogénétique, plus particulièrement celles codant des protéines essentielles au métabolisme bactérien sont utilisées pour explorer les relations taxonomiques entre espèces à l'intérieur d'un genre voire entre souches d'une même espèce selon le niveau de polymorphisme observé (Yamamoto et Harayama 1995, 1998 ; Kwok *et al.*, 2002). Il n'en reste pas moins que le séquençage d'un fragment du gène 16S, généralement celui codant la sous unité 16S, reste la méthode la plus utilisée. En 1980, le nombre d'espèces de vibrions décrites était de 20, en 2002 de 54, il est aujourd'hui supérieur à 70.

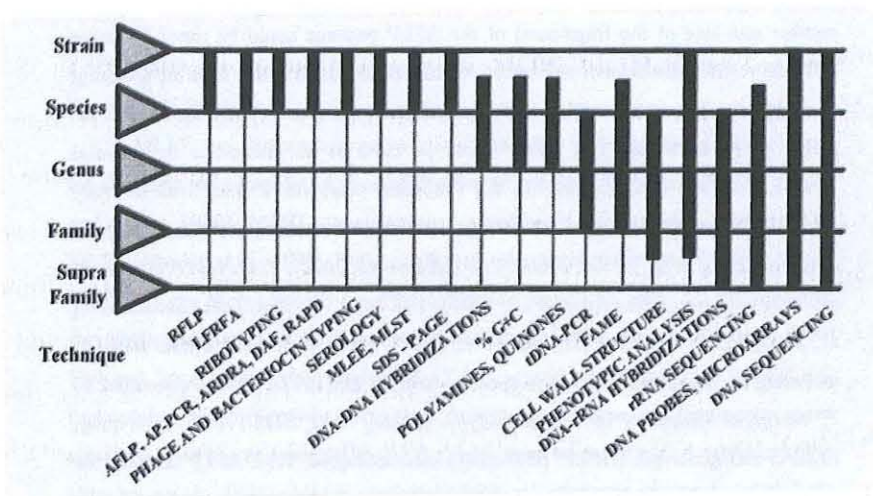


Figure 12 : Résolution taxonomique des techniques les plus couramment utilisées (d 'après Vandamme et al., 1996)

L'identification d'une souche en terme d'espèce doit être confirmée par des expériences d'hybridation ADN/ADN qui reste la technique de référence selon les dernières recommandations du comité « Ad hoc » en systématique bactérienne (Stackenbrandt, 2002) : « deux souches appartiennent à la même espèce si elles présentent un taux d'hybridation ADN-ADN > 70% (Wayne, 1987) ». Le principe de cette technique consiste à évaluer la similitude de séquence nucléotidique de l'ADN de deux souches en étudiant le % de réassociation de ces deux ADN, rendus simple brins initialement, une fois renaturés. Plus les séquences d'ADN des micro-organismes sont proches et plus on obtient un pourcentage élevé de duplex ADN/ADN hétérologues. La stabilité des hybrides est également évaluée en déterminant la température requise pour la dissociation des hybrides ADN/ADN (T_m , ou température de demi-dénaturation de l'hybride, c'est à dire la température pour laquelle 50 % des molécules d'ADN sont dénaturées). La différence de stabilité thermique $\Delta T_m(e)$, observée entre les $T_m(e)$ mesurées dans une réaction homologe et dans une réaction hétérologue, mesure très précisément le degré d'homologie des duplex et est directement corrélée avec le pourcentage de bases non appariées.

Le développement de techniques alternatives est certes encouragé (Stackenbrandt, 2002), mais aucune d'entre elles n'est aujourd'hui reconnue par la communauté des systématiciens comme pouvant supplanter la technique d'hybridation ADN/ADN.

Du fait de l'évolution des techniques en systématique bactérienne et du nombre grandissant d'isolats étudiés, la classification des procaryotes a profondément été modifiée ces 30 dernières années (voir Figure 12 page ci-contre). C'est notamment le cas du genre *Vibrio*. Dans la deuxième édition du Bergey's manual of Systematic Bacteriology (Garrity et al. 2002) la famille Vibrionaceae comporte 6 genres : *Vibrio* (54 espèces), *Photobacterium* (8), *Listonella* (2), *Salinivibrio* (1), *Enhydrobacter* (1) et *Allomonas* (1). Les Vibrionacées sont aujourd'hui placées dans le phylum des Proteobacteria, phylum qui contient 1600 espèces réparties en 5 classes : Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria (incluant Vibrionaceae), Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria.

III - Contexte scientifique, problématique et Objectif du stage :

Depuis 1991 les élevages d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*, principale activité aquacole de la France en terme de chiffre d'affaires, sont confrontés à des mortalités saisonnières sévissant uniquement l'été et affectant les jeunes huîtres élevées en milieu naturel sur l'estran ou en condition artificielle en éclosier. De nombreuses études ont été menées



notamment en pathologie pour comprendre l'étiologie d'un tel syndrome. Dès 1995, le Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP) de la station Ifremer de La Tremblade a étudié les souches bactériennes associées à ces épisodes de mortalité dans des élevages de *Crassostrea gigas*. Parmi les souches isolées, la souche dénommée TNEMF6, s'est révélée être pathogène en infection expérimentale et a été identifiée comme appartenant à l'espèce *V. splendidus* biovar II (Waechter et al., 2002)

L'espèce *splendidus* a été créée en 1900 par Beijerinck pour décrire des souches bactériennes isolées de l'environnement marin. En 1979, cette espèce a été transférée dans le genre *Beneckeia* (*Beneckeia splendida*) puis, en 1981, dans le genre *Vibrio* (*Vibrio splendidus*). Cette espèce est ubiquiste dans l'environnement marin et plusieurs souches sont associées à des épisodes de mortalité chez divers mollusques, la coquille *St Jacques* *Pecten maximus* (Nicolas et al., 1996), l'huître *C. gigas* (Sugumar et al. 1998, Lacoste et al. 2001, Waechter et al. 2002) la palourde *Ruditapes decussatus* (Gomez-Leon et al. 2005); chez le poisson avec le turbot *Scophthalmus maximus* (Farto *et al.* 1999, Gatesoupe et al. 1999, Thompson et al. 2005) et chez les cnidaires et les gorgones en particulier (Martin et al. 2002).

D'autres souches phénotypiquement apparentées à *V. splendidus* biovar II et isolées d'huîtres dans un contexte épidémiologique de mortalité estivale ont été par la suite caractérisées au Laboratoire. Une première étude comparative par phénotypage (39 tests biochimiques) et génotypage (PCR-RFLP sur trois gènes conservés et hybridation ADN/ADN) révèle la grande diversité génotypique de ces souches puisqu'une seule souche sur 14 est trouvée proche de TNEMF6, sans pour autant être identique ou d'origine clonale (Le Roux et al., 2002). Une deuxième étude taxonomique portant sur un nombre beaucoup plus important de souches (n=125) a ensuite été entreprise au Laboratoire. Au cours de l'été 2001, des animaux vivants voisins d'huîtres creuses subissant des mortalités estivales ont été placés en aquarium avec des animaux de l'écloserie de l'IFREMER réputés sains pour des expériences de cohabitation. Dans 9 cas sur 12 une transmission du syndrome « mortalité » a été observée laissant supposer une origine infectieuse du phénomène. Un isolement de la flore *vibrionaceae* a été effectué à partir d'hémolymphe d'huîtres moribondes et d'huîtres saines. Ces souches ont été caractérisées par une approche polyphasique : phylogénie moléculaire des gènes codant la sous unité ribosomal 16S (gène 16S) ou la sous-unité β de l'ADN gyrase (gène *gyrB*), qui est responsable de l'introduction de super-tours négatifs à l'intérieur du chromosome bactérien et qui intervient donc dans la réplication des chromosomes bactériens (Watt and Hickson, 1994); hybridation

ADN/ADN et phénotypage basé sur des tests biochimiques classiques. Cette étude a montré que la majorité des vibrions isolés d'animaux sains ou malades sont apparentés par leur phénotype à l'espèce *V. splendidus*. Cependant les approches moléculaires basées sur l'hybridation ADN/ADN et la phylogénie sur le gène *gyrB* révèlent que ces souches, apparentées à *V. splendidus*, appartiennent en fait à un groupe génétique complexe constitué de plusieurs espèces *V. splendidus* bien sûr mais également *V. lentus*, *V. chagasii*, *V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis*, *V. cyclitrophicus*, *V. crassostreae*, *V. gigantis*. A noter que ces 8 dernières espèces ont toutes été décrites récemment (Hedlund et Staley 2001, Macian et al. 2001, Thomson et al. 2003a, Thomson, 2003b, Faury et al. 2004, Le Roux et al. 2005) ce qui laisse augurer de nouvelles descriptions.

D'un point de vue méthodologique, cette étude révèle également que la taxonomie établie sur la phylogénie du gène *gyrB* est congruente avec la méthode de référence que constitue les hybridations ADN/ADN (Le Roux et al. 2004), contrairement à la phylogénie basée sur le gène codant la sous unité 16S ribosomique (16S rDNA) qui n'est pas assez discriminante. Lors de son travail de thèse, Thompson (2003b) a typé 506 souches *Vibrio* par la technique d'AFLP (Arbitrarily Fragment Length Polymorphism) qui consiste en l'analyse des polymorphismes de taille d'amplicons générés par PCR aléatoire à l'aide d'amorces arbitraires. Quinze nouvelles espèces de *Vibrio* ont ainsi pu être décrites, Thompson et coll démontrent ainsi que la technique d'AFLP constitue également une bonne alternative aux hybridations ADN/ADN.

Le phénotypage présente un intérêt taxonomique limité pour l'étude de ce groupe polyphylétique. En effet le nombre de caractères discriminants permettant de distinguer deux espèces apparentées à *V. splendidus* est très faible et l'on observe fréquemment pour des souches appartenant à la même espèce une variabilité des réponses phénotypiques selon la souche considérée. Pour illustrer ce fait il n'existe qu'un caractère parmi une centaine étudiée (Le Roux et al. 2005) permettant de distinguer phénotypiquement *V. gigantis* de *V. crassostreae*, il s'agit de l'utilisation ou non du sucrose comme unique source carbonnée. Concernant l'utilisation ou non du maltose par les souches *V. gigantis*, les réponses sont variables, la majorité l'utilise (3 des 4 souches étudiées), tandis qu'une est incapable de métaboliser ce sucre.

Ainsi le séquençage du gène *gyrB* apparaît comme un outil taxonomique de choix pour l'identification présumptive des souches apparentées à *Vibrio splendidus* telles que *V. chagasii*, *V. splendidus*, *V. cyclitrophicus*, *V. crassostreae* et *V. gigantis*, l'hybridation ADN/ADN demeurant une technique lourde à mettre en œuvre car dispendieuse en temps et

	Hybridation ADN-ADN (%)	
	LGP31	LGP32
LGP 31	100	81
LGP32	79	100
V. kanaloae	92	87
V. pomeroyi	72	76
V. lentus	64	63
V. splendidus	56	62
V. cyclitrophicus	40	53

Fig 14 : Sur la base des taux d'hybridation obtenus, LGP31 et LGP 32 appartiennent à la fois à l'espèce *V.kanaloae* et à l'espèce *V. pomeroyi*.

qui présente l'énorme inconvénient de ne pas fournir des résultats cumulatifs. D'autres gènes codant d'autres protéines essentielles au métabolisme bactérien ont été recherchés pour confirmer voire améliorer la phylogénie *gyrB* (Le Roux et al. 2005). Il s'agit du facteur sigma 70 (gène *rpoD*) qui détermine la spécificité de reconnaissance de l'ARN polymérase vis à vis du promoteur lors de l'initiation de la transcription (Lonetto et al. 1992), du gène *rctB* codant une protéine impliquée dans la réplication chromosomique (Egan et Waldor, 2003) ou encore du gène *toxR* qui code une protéine membranaire à fonction activatrice, et qui est impliqué dans la régulation de la virulence pour plusieurs espèces de *Vibrio* pathogènes (Osorio et Klose, 2000). Les résultats obtenus sont congruents avec la phylogénie *gyrB* ainsi qu'avec les taux d'hybridation ADN/ADN. En revanche il semble impossible actuellement de distinguer les quatre espèces suivantes *V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis* et *V. lentus*, sur la base de la phylogénie *gyrB*.

Deux hypothèses peuvent être formulées :

- Le faible nombre de souches apparentées à *V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis* et *V. lentus* introduit un biais méthodologique à l'analyse phylogénétique (voir Figure 13 page suivante)
- L'existence d'un continuum de souches rend impossible la délimitation de la notion d'espèce (voir Figure 14 page ci-contre).

Afin de tester la première hypothèse nous nous sommes donc fixés pour objectif principal d'étudier la structuration génétique d'un ensemble de 140 souches bactériennes d'origine marine afin d'identifier de nouvelles souches d'intérêt phylogénétique apparentées à *V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis* et *V. lentus*.

Parallèlement à cette recherche, nous avons tenté de mettre au point une technique d'identification moléculaire basée sur le principe des puces à ADN : les macroarrays. Afin d'accélérer la recherche de souches d'intérêt phylogénétique et contribuer au développement d'outils d'identification taxonomique performants et peu onéreux.

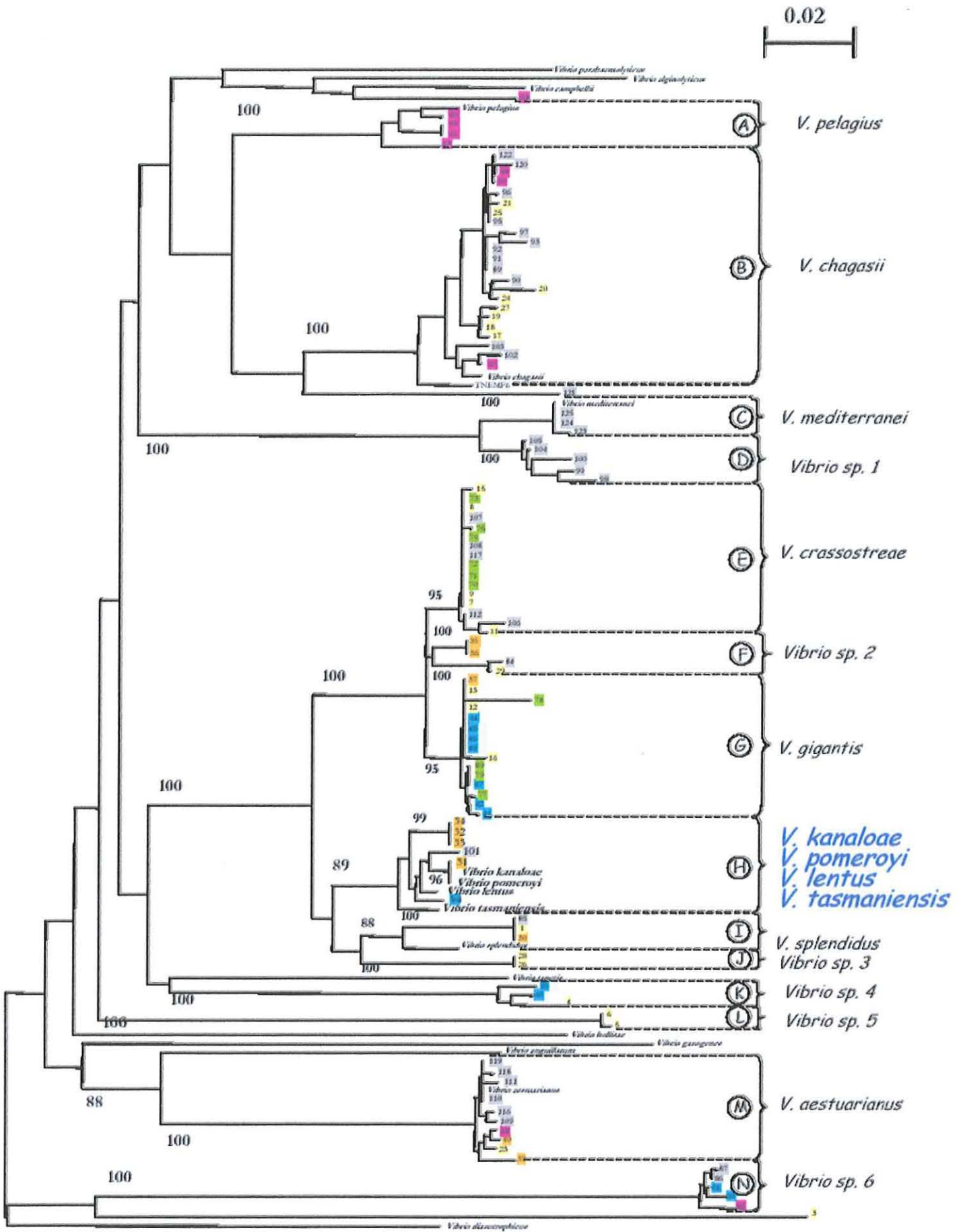


Figure 13: Arbre phylogénétique basé sur les séquences partielles du gène *gyrB* (588 pb). Les noms de 125 souches de la collection 2001 constituée par Mélanie Gay (2004) sont surlignés en fonction des expérimentations de cohabitation (origine des huîtres) : jaune = Arcachon ; orange = Fouras ; bleu = Perquis ; rose = Nurserie ; vert = Trinité ; gris = témoins négatifs. Le groupe H comprend 10 souches dont 4 souches types.

DEUXIÈME CHAPITRE
MATÉRIELS ET MÉTHODES

Souches fournies par le LMG Belges.

Souches	Source d'isolement	Identification	Références
LMG 21521	Larve d'huître moribondes (France)	Vibrio kanaloae sp. nov. (FAFLP)	Thompson et al. 2001
LMG 11753	Eau de mer (USA)		
LMG 21522	Crevette (Chine)		
LMG 19269	Larve de bivalve sain (Brésil)	Vibrio pomeroyi sp. Nov (FAFLP)	
LMG 21351	Turbot (Espagne)		
LMG 21352	Turbot (Espagne)		
LMG 21574	Saumon Atlantique (Tasmanie)	Vibrio tasmaniensis (FAFLP)	
LMG 21575			
LMG 21576			

Souches fournies par l'université de Vigo en Espagne.

Souches	Source d'isolement	Typage	Références
16 N	Turbot malade (Espagne)	Vibrio pelagius (phenotypage)	Angulo et al. 1992
43 N			
P 52	Cœurs branchiaux de poulpe présentant des lésions cutané	<i>Vibrio lentus</i> (ribotypage et phénotypage)	Farto et al. 2002
P 54		<i>Vibrio lentus</i> (séquençage gène 16S)	
P 57		<i>Vibrio lentus</i> (ribotypage et phénotypage)	

Souches fournies par le LPI du centre IFREMER de Brest.

Souches	Source d'isolement	Séquençage 16S
01/057 (Contaminée lors de la réception)	Mortalité estivales d'huître creuse (MOREST)	Fouras <i>Vibrio splendidus</i> like
01/083		Argenton <i>Vibrio splendidus</i> like
01/100		Arcachon <i>Vibrio splendidus</i> like
01/104		Arcachon <i>Vibrio splendidus</i> like
01/105		Arcachon <i>Vibrio splendidus</i> like
01/108		Arcachon <i>Vibrio splendidus</i> like
01/114		Sète <i>Vibrio splendidus</i> like
01/189		Normandie <i>Vibrio splendidus</i> like
01/323		Normandie <i>Vibrio splendidus</i> like
02/069		Bouin <i>Vibrio splendidus</i> like

I - Souches bactériennes :

Les souches bactériennes étudiées lors de ce stage ont quatre origines différentes et totalisent 140 souches.

- Une collection de souches de Vibrios constituée au LGP de l'Ifremer La Tremblade (voir Annexe 1): Cette collection a été établie durant l'été 2002 dans le cadre de la thèse de Mélanie GAY (GAY, 2004) au LGP et totalise 115 souches. Toutes ont été isolées à partir d'hémolymphe d'huître creuse *C. gigas* lors d'expériences de cohabitation menées *ex-situ* avec des huîtres provenant d'élevages confrontés au syndrome de mortalité estivale, selon une méthodologie identique à celle qui a permis la constitution de la collection 2001 (cf partie problématique). Brièvement, dès que des mortalités apparaissent en aquarium, les hémolymphe de 3 huîtres moribondes sont prélevées par ponction dans la cavité péricardique et mélangées. Les échantillons d'hémolymphe sont étalés (purs et dilués au 1/10, 1/100, 1/1000) sur milieu Zobell (*voir composition Annexe 2*), permettant d'isoler la flore hétérotrophe totale et sur TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Saccharose. *Voir Annexe 2*), milieu sélectif pour la flore *Vibrionaceae*. Les boîtes sont incubées à 20 °C. Après 24 h de culture, les géloses sont observées et trois colonies de chaque type macroscopique sont choisies arbitrairement et repiquées deux fois sur milieu Zobell afin d'obtenir une culture pure. Une fois cette culture pure obtenue, chaque souche est conservée à -80 °C en cryotubes dans du milieu Zobell liquide contenant 10 % de glycérol.

- Des souches Vibrio provenant du Laboratoire de Microbiologie de Ghent en Belgique (Souchier Belge : SB).

- Des souches Vibrio provenant du laboratoire de Microbiologie de l'Université de Vigo, en Espagne (Souchier Espagnol : SE).

- Des souches Vibrio provenant du Laboratoire de Physiologie des Invertébrés (LPI) de l'Ifremer à Brest (Souches LPI).

Voir tableaux page ci-contre.

II - Extraction d'ADN :

Deux méthodes d'extraction de l'ADN génomique bactérien ont été utilisées et testées au cours du stage. D'une part un protocole classique d'extraction d'ADN au phénol-chloroforme, et d'autre part nous avons utilisé un protocole faisant appel à un réactif d'extraction d'ADN fourni par la société *VIAGEN - Biotech®*.

II.1 - Protocole classique au phénol-chloroforme :

Quelques colonies bactériennes d'une souche pure cultivée en Zobell-agar sur boîte de Pétri sont prélevées stérilement à l'aide d'une pipette Pasteur afin d'inoculer un tube de polypropylène de 15 ml rempli au tiers avec du milieu de Zobell liquide stérile. Chaque souche est incubée à 20°C pendant 12 heures et sous agitation modérée. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3200g pendant 10 minutes dans une centrifugeuse thermorégulée à 20°C. Le surnageant de culture est soigneusement éliminé et le culot cellulaire est repris avec 5 mL de solution de lyse (NaCl 100 mM, Tris 10 mM pH 8, EDTA 25 mM pH 8, SDS 0.5 %, protéinase K 0.2 mg.mL⁻¹). La lyse bactérienne s'effectue à 54°C pendant 3 h. L'extraction de l'ADN se fait ensuite selon trois phases successives.

II.1.1 - Extraction de l'ADN par séparation de la phase protéique :

A l'issue de la lyse, un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (soit 5 ml) (25 : 24 : 1 final, pH : 7.8) est ajouté et mélangé à l'ensemble afin d'obtenir une suspension laiteuse. Après centrifugation à 3200 g pendant 5 minutes, la phase aqueuse supérieure est récupérée à l'aide d'une pipette et une nouvelle extraction au phénol / chloroforme / alcool isoamylique est réalisée.

II.1.2 - Précipitation des acides nucléiques :

Les acides nucléiques sont précipités en ajoutant 500 µL d'acétate de sodium 3M (1/10^{ème} du volume total) et 10mL d'éthanol absolu (2 volumes). L'ADN forme une pelote visible à l'œil nu qui est récupérée à l'aide de l'embout d'une pipette Pasteur boutonnée. Après élimination des sels par trempage dans une solution d'éthanol à 70% pendant 5 minutes, la pelote d'ADN est séchée à l'air libre.

II.1.3 - Conservation de l'ADN :

La pelote est ensuite re-suspendue dans 100µL d'eau de qualité biologie moléculaire fournie par la société *Sigma-Aldrich*[®] contenant de la RNase à 100µg/mL finale. La concentration en ADN des échantillons est déterminée au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 260 nm puis ajustée avec de l'eau à 100 ng.µL⁻¹. Un dernier contrôle de la concentration et de la qualité des ADN extraits est réalisé en faisant migrer 5µl d'échantillon sur un gel d'agarose à 1% préparé en tampon TAE (0.8 mM de Tris base, 0.8 mM d'acide acétique, 20 µM de Na₂EDTA, pH 8). Les ADN sont stockés à 4°C.

II.2 - Protocole avec le réactif d'extraction VIAGEN-Biotech® :

Ce réactif commercialisé sous le nom : « DirectPCR Lysis Reagent » a été mis au point au départ pour la lyse de différents tissus de souris (queues, embryons) et de cellules cultivées *in vitro* afin de faciliter les analyses de génotypage nécessitant le traitement d'un grand nombre d'échantillons. Nous avons choisi d'évaluer son efficacité sur des cellules bactériennes, compte tenu de la simplicité du protocole d'utilisation de ce réactif et de l'absence de toxicité, contrairement à l'utilisation du phénol.

1 mL de bouillon bactérien préparé de façon identique à précédemment, est centrifugé à 3200 g pendant 10 minutes. Le culot bactérien est repris dans 500 µL de réactif DirectPCR supplémenté avec 200 µg.mL⁻¹ final de protéinase K. Les tubes sont incubés à 55°C durant 3 h sous agitation régulière puis chauffés à 85°C pendant 45 minutes afin d'inactiver la protéinase K. Cet extrait est compatible avec la réaction de PCR et est par conséquent directement utilisable, à raison de 1 à 2 µL par réaction.

III – Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :

III.1 – Préparation d'une réaction de PCR:

Le volume réactionnel total de la PCR est de 50µl. Un mélange ou « prémix » est réalisé comportant tous les ingrédients nécessaires à « n » réactions PCR hormis l'échantillon d'ADN. Les concentrations finales de chacun des réactifs sont les suivantes :

Taq polymerase (<i>New England Biolabs</i> ®)	2.5 à 5 u/ vol total
Tampon 10x (<i>New England Biolabs</i> ®)	1x
MgCl ₂ (<i>New England Biolabs</i> ®)	2,5 mM
Amorce sens (Eurogentec)	0.1 à 0.5 µM
Amorce antisens (Eurogentec)	0.1 à 0.5 µM
dNTPs 20mM (Promega)	0.2 mM
ADN génomique 100 ng/µl	200ng –500ng / vol total

On commence par l'eau avant de finir obligatoirement par l'enzyme. L'ordre d'ajout des autres composants n'est pas important. Le prémix est distribué puis l'ADN est ajouté. Généralement des plaques 96 puits ont été utilisées sauf dans le cas de la production de sondes marquées par PCR où des tubes à bouchons sont préférés. Lorsque le fragment d'ADN à amplifier est présent en copies multiples au sein du génome bactérien (16S rDNA par exemple) 200ng/réaction PCR suffisent, par contre si le gène est en faible nombre de

Gène cible	Nom de l'amorce	Séquence 5' – 3'	Température d'hybridation (°C)
16S	16SsM13	<u>CAGGAAACAGCTATGACCAGAGTTTGATCATGG</u> CTCAGA	50
	16SasM13	<u>GTAAAACGACGGCCAGGTTACCTTGTTACGACT</u> T	
<i>gyrB</i>	UP1E	<u>GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNCGGNGGNAARTTY</u> RA	58
	UP2AR	<u>AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTC</u> NA GCRTCNGYCAT	
<i>toxR</i>	toxRs	GANCARGGNTTYGARGTNGAYGAYTC	58
	toxRas	TTDKKTTGNCCNCYNGTVGCDATNAC	

copie on utilisera 500ng/réaction (cas du gène *gyrB* en une seule copies au sein du génome de *V. cholerae*).

La séquence des amorces et la température d'hybridation utilisée lors de la PCR sont présentées dans *le tableau page ci-contre*. Les séquences soulignées ne sont pas spécifiques d'un gène donné mais ont été rajoutées en 5' afin de permettre le séquençage direct d'un produit PCR. Dans le cas particulier de l'utilisation d'amorces dégénérées (gènes *gyrB* et *toxR* notamment) la concentration finale en amorces souhaitée dans le mix réactionnel est de 0.5 μM et non de 0.1 μM (gène 16S).

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 2 min, suivie de 35 cycles successifs - 1min à 94°C, 1 min d'hybridation à la température souhaitée, 2 min d'élongation à 72°C – et enfin d'une étape d'élongation terminale des fragments d'ADN à 72°C pendant 10 min.

III . 2 – Visualisation des amplicons

Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse en ayant préparé un gel d'agarose à 1 % (poids/volume) contenant 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de bromure d'éthidium et préparé en tampon TAE 1X. Les échantillons sont mélangés à un tampon de charge (0,25 % de bleu de bromophénol, 0.25 % de xylène cyanol FF, 40 % de saccharose) à raison de 2 μL de tampon pour 10 μL d'échantillon puis déposés dans les puits du gel. Après une électrophorèse à 110 Volts pendant 30-50 min le gel est observé sous une lampe UV pour permettre une visualisation des amplicons.

IV – Typage moléculaire des souches bactériennes :

Trois types de techniques ont été utilisées au laboratoire à des fins d'identification bactérienne qui ont toutes recours à l'amplification génique par PCR. Elles diffèrent chacune par le système de détection utilisé :

-La PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ou analyse du polymorphisme de taille d'un produit PCR digéré par une ou plusieurs enzymes de restriction.

-Le séquençage du produit PCR d'intérêt.

-L'hybridation d'une sonde marquée froide, générée par PCR, à un oligonucléotide spécifique de l'espèce bactérienne que l'on souhaite identifier (macroarray).

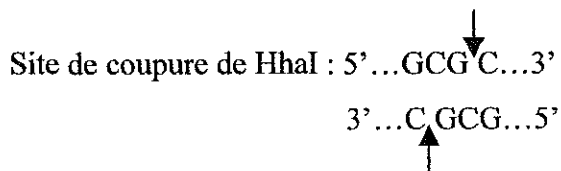
IV . 1 – Analyse RFLP :

IV . 2.1 – Principe :

La PCR-RFLP repose sur la mise en évidence de la variabilité de la séquence nucléotidique d'un gène d'intérêt qui a été préalablement amplifié par PCR. L'amplicon est digéré par une ou plusieurs enzymes de restriction spécifiques d'un motif nucléotidique, les profils générés sont visualisés sur gel d'agarose. Le polymorphisme détecté est dû à des mutations au niveau des sites de restriction de l'enzyme (polymorphisme de site de restriction) et/ou à des délétions/insertions de fragment(s) d'ADN.

IV . 2.2 – Technique :

La première étape consiste à amplifier par PCR le gène d'intérêt (*gyrB* dans cette étude) et à digérer ensuite l'amplicon avec 4 unités de l'enzyme *HhaI* (10u/μl) qui reconnaît



le motif nucléotique indiqué sur *la figure ci-contre*, en présence du tampon ad hoc pour l'enzyme et dans un volume final de 20μl. Les échantillons sont ensuite incubés à 37°C pendant 2 h. Au cours de

cette étude, nous avons fait évoluer les conditions de digestion, en augmentant le temps d'incubation à 3 h afin de limiter le phénomène de digestion partielle.

IV . 2 – Séquençage des produits PCR et alignement de séquences :

Il est nécessaire de purifier les produits PCR destinés au séquençage afin d'éliminer notamment les nucléotides et les amorces en excès non incorporés durant l'étape de PCR.

IV . 2.1 – Purification des produits PCR :

Les produits PCR sont purifiés en utilisant le kit « Qiaex II Gel extraction kit » fourni par la société Qiagen. Après migration par électrophorèse des produits PCR sur gel d'agarose en présence de BET, chaque amplicon est récupéré en découpant le gel sous lumière ultraviolette et en plaçant le morceau de gel dans un tube. Le poids du gel extrait est mesuré sur une balance. On verse alors 4 volumes de tampon de lyse QX1 et 10 μL de micro billes Qiaex II ayant la capacité de fixer l'ADN dans chaque tube. Après une incubation à 50°C pendant 10 min et un mélange régulier du contenu des tubes permettant une solubilisation complète de l'agarose, on procède à un rinçage (tampon QX1) puis lavage des billes (tampon PE additionné d'éthanol) par une succession de centrifugation des

tubes à 10 000 g pendant 1 min. Une fois le surnageant éliminé soigneusement, le culot contenant les billes est séché à l'air. L'ADN est ensuite élué des billes par ajout de 50 µL d'H₂O de qualité biologie moléculaire (*Sigma Aldrich*[®]). Après 10 min d'incubation à température ambiante et centrifugation des tubes (1 min à 10000g), le surnageant contenant les produits PCR est récupéré puis stocké à -20°C.

IV . 2.2 – Réaction de séquence :

Le principe de cette réaction consiste à générer une multitude de fragments d'ADN copies conformes de l'ADN matrice de départ, mais de toutes les tailles possibles afin d'être en mesure de déterminer, après migration électrophorétique de ces différents fragments ADN, leur séquence nucléotidique. 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 dès lors qu'ils sont incorporés par la polymérase. En effet, l'absence d'un groupement hydroxyle sur le carbone 3' interdit la formation d'une liaison phosphodiester avec un autre nucléotide.

Un volume de 6,3 µL maximum de produit PCR purifié est déposé dans chaque puit d'une plaque de séquençage à 96 puits. Les échantillons sont dénaturés à 96°C pendant 2 minutes. On ajoute ensuite dans chacun des puits, un premix pour réaction de séquençage (10 µl qsp) constitué de :

- 1,5 µL d'amorce de séquençage à 5 µM sens ou antisens dont la séquence 5'-3' est indiquée ce dessous

Amorces	sens	antisens
16S	CAGGAAACAGCTATGACC	GTAAAACGACGGCCAG
<i>gyrB</i>	GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA	AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCC

- 1,8 µL de Tampon de séquençage 5X (Commercialisé par la société AppliedBiosystems[®])
- 0,4 µL de mix de séquençage appelé Big dye V3 (BDV3) (Commercialisé par la société AppliedBiosystems[®]) contenant les 4 désoxynucléotides (dA,dT,dC,dG), les 4 didésoxy nucléotides (ddA,ddT,ddC,ddG) marqués chacun par un fluorochrome distinct, et l'ADN polymérase.

La réaction de séquence est réalisée ensuite dans un thermocycleur (PCR system 2700 Gene Amp[®] de chez AppliedBiosystems[®]) de la même manière qu'une réaction d'amplification PCR, c'est à dire en exécutant une série de cycle chacun constitué de trois phases de températures distinctes :



Séquenceur automatique ABI Prism 3100-*AVANT* Genetic Analyzer
Applied Biosystems®.

- dénaturation des doubles brins d'ADN : 96°C durant 10 secondes.
- Hybridation de l'amorce : 50°C durant 5 secondes
- Elongation du brin d'ADN : 60°C durant 4 minutes.

} 25 fois

IV . 2.3 – Précipitation de la réaction de séquençage :

Il est nécessaire de précipiter la réaction de séquençage afin d'éliminer au maximum les ddNTPs non incorporés. Chaque réaction de séquençage est précipitée avec 35 µL d'éthanol à 95%. Après une incubation à 4°C pendant 15 minutes, la plaque de séquençage est centrifugée à 3200g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé par retournement de la plaque et le culot rincé avec 200 µL d'éthanol à 70% afin d'éliminer les sels. Après une nouvelle centrifugation (4000g, 20 min., 4°C) le culot est séché au Speed Vac® durant 15 minutes puis repris avec 10 µL de Formamide, agent dénaturant qui assure la remise en suspension des fragments d'ADN séquencés.

IV . 2.3 – Obtention et traitement des séquences:

Le LGP est doté d'un séquenceur automatique à 4 capillaires ABI Prism 3100-*AVANT Genetic Analyzer* commercialisé par la société AppliedBiosystems® (voir photo page ci-contre). Une fois les séquences obtenues, les ambiguïtés voire les erreurs de séquence sont identifiées puis corrigées manuellement grâce aux logiciels Bio-Edit et Chromas. Bioedit permet en effet d'aligner les différentes séquences obtenues avec celles déjà validées ce qui permet d'avoir un système de référence pour le contrôle des nouvelles séquences: respect des zones conservés du gène 16S ou du cadre de lecture pour le gène *gyrB*. Chromas permet quant à lui la lecture du chromatographe brut et l'interprétation de certaines anomalies (observation de pics minoritaires ou non significatifs passés inaperçues, problèmes liés à l'apparition de bulles dans le capillaire,...)

Pour étudier les relations de parenté entre séquences nucléotidiques, différents algorithmes sont disponibles dans la littérature qui permettent de les représenter sous forme d'arbre phylogénétique. La première étape consiste en l'alignement des séquences correspondant à un gène particulier, les séquences nucléotidiques obtenues au cours de ce stage ou celles disponibles dans les banques de données comme GenBank accessibles depuis le site de NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, en s'aidant de l'outil de recherche Blast. Dans une deuxième étape nous avons utilisé les logiciels Phylo-win et Seaview (Galtier *et al.*, 1996) qui permettent le traitement et la représentation phylogénétique des données de séquence. Nous avons utilisé la méthode la plus couramment utilisée en phylogénie dénommée

LGP31	G C G A A G T C G G C C A	G T A A C C A T C A G G T T A A A C C T A A A G A A G	A A A G T T G A A T A A A T G G
LGP101	G C G A A G T C G G C C A	G T A A C C A T C A G G T T A A A C C T A A A G A A G	A A A G T T G A A T A A A T G G
V. kanaloae T (Tkr)	G C G A A G T C G G C C A	G T A A C C A T C A G G T T A A A C C T A A A G A A G	A A A G T T G A A T A A A T G G
LGP32	G C A A A G T C G G C C A	G T A A C C A T C A G G T T A A G C C T A A A G A A G	A A A G T T G A A T A A A T G G
V. tasmaniensis T (Ttr)	A T C G A G T A G G C C A	A T A A C C A T C A G G C T A A G C C T A A A A C T G	A A A G C T C G G A A A T G G
V. pomeroy T (Tpr)	G C G A A G C T G A C C A	G C C G A G T T C C T G C G A A A T C C G C C A	A A A G C A C A A T A A G T G G
V. pomeroy LMG21352	G C G A A G C T G G C C A	G C C G A G T T C C T G C G A A A T C C G C C A	A A A G C A C A A T A A G T G G
V. lentus T (Tlr)	G C T G A A G T A G A C C A	A A A G G G C A C A A A C G T T G C G G A A C	A A A A T G T A A T A A G T G G
V. lentus LGP54	A C T G A A G T A G A C C A	A A A G G G C A C A A A C G T T G C G G A A C	A A A A T G T A A T A A G T G G
V. gigantis T (Tgr)	G T A G A A G T A G G C C A	G C A A C C G T T C C T G T T T G A C T C C A G T T A	A A A A T A C C A A T A A A T G G
V. gigantis LGP16	G T A G A A G T A G G C C A	G C A A C C G T T C C T G T T T G A C T C C A G T T A	A A A A T A C C A A T A A A T G G
V. gigantis LGP37	G T A G A A G T A G G C C A	G C A A C C G T T C C T G T T T G A C T C C A G T T A	A A A A T A C C A A T A A A T G G
V. gigantis LGP45	G T A G A A G T A G G C C A	G C A A C C G T T C C T G T T T G A C T C C A G T T A	A A A A T A C C A A T A A A T G G
V. crassosreae T (Tcr)	G T A G A A C T A G A C C A	G C A A C C G T T C C T G T T A G G T C C C C T A	A A A A C A C C A T A A G T G G
V. splendidus T (Tsr)	G T T G A A G T G G A C C A	G C A A C A A C A C C A A C T G G G G C C G G T T A	A A A G C A C C A T A A G T G G
V. chagasii T (Tchr)	A C T G A G G T T G G T T A	A C T A A G T A C C T G C A A C A A C T G A A G C T A	A A A A C G C A A C A A G T G G
V. cyclitrophicus21580 (TcyR)	G T T G G T G G C C A	A C C T A A C G C C C G T T A G G T T G A C C A	A C A C --- A A T A A A T G G
V. harveyi	--- G C T C A C C A	T T A A A T C --- G A C C T G C A C A A	A G A C A A A C T G G T T A

Alignement des séquences *toxR* des souches types sur le logiciel BioEdit.

Neighbour Joining Method, NJM, en utilisant un modèle d'évolution des séquences qui est celui de Kimura stipulant que les événements de transversions (remplacement d'une base purique par une base pyrimidique ou vice-versa) n'ont pas la même probabilité de se produire que les transitions (remplacements de bases puriques ou pyrimidiques entre elles).

IV . 3 –Macroarray :

IV . 3.1 – Principe :

Le principe du macroarray réside dans la reconnaissance, c'est à dire l'hybridation, entre deux molécules d'ADN simples brins complémentaires. L'échantillon d'ADN est marqué radioactivement ou à froid puis mis en contact avec le macroarray portant plusieurs fragments d'ADN ou des oligonucléotides de séquence connue. Si le nombre de fragments cibles est élevé sur un support miniaturisé on parle encore de puces ADN.

IV . 3.2 – Séquence des oligonucléotides déposés sur la membrane

Les oligonucléotides que nous avons choisi d'utiliser ont été déduits de l'analyse des séquences nucléotidiques de gènes de ménage obtenues récemment au Laboratoire à partir des souches type d'espèces de *Vibrio* apparentés au groupe *V. splendidus* (Le Roux et al. 2005). Le gène *toxR* a été sélectionné car une région hypervariable a été identifiée utile au design d'oligonucléotides spécifiques d'espèces (*voir figure page ci-contre*).

IV . 3.3 – Marquage de l'échantillon d'ADN provenant de la souche :

Le marquage de l'échantillon d'ADN de la souche à typer est effectué par PCR à l'aide des amorces dégénérées *toxR* en ajoutant au mélange réactionnel de PCR un dNTP marqué à la digoxigénine à la concentration finale de 250 µM. La Digoxigénine (Digoxigenin-3-O-succinyl-ε-aminocaproyl-[5-(3-aminoallyl)-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate] tetralithium salt) fournie par la société *Roche Diagnostics*, est une molécule qui est fixée à un nucléotide particulier : l'Uridine par une liaison alkali-labile ester (DIG-11-dUTP). Ce nucléotide particulier est incorporé par la Taq Polymérase lors de l'amplification PCR à la place des dTTPs également présents dans le mix réactionnel selon un ratio Dig-dUTP/dTTP proche de 50%. Cette molécule est ensuite reconnue par un anticorps anti-Dig couplé à la phosphatase alcaline. L'hybride ADN/ADN marqué à la digoxigénine est révélé en utilisant un substrat pour la phosphatase alcaline : le NBT/BCIP dans le cas d'une détection colorimétrique visible à l'œil nu ou le CSPD dans le cas d'une détection par chemiluminescence.

IV . 3.4 – Conception des membranes de nylon :

Les membranes de nylon sont de type *Immobilon-Ny+* commercialisées par la société *Millipore*[®]. Elles sont chargées positivement pour permettre la fixation des oligonucléotides d'ADN chargés négativement. Un 1µL d'oligonucléotide est déposé à l'aide d'une micropipette sur les membranes. Lorsque l'ensemble des dépôts est réalisé, on laisse sécher quelques minutes à température ambiante, puis on place la membrane sous U.V pendant 1 à 5 minutes face de dépôt vers la lampe U.V. Cette étape de « cross-linking » permet en effet de fixer les oligonucléotides aux molécules de Nylon par l'établissement de liaison covalente.

IV . 3.5 – Pré-hybridation et hybridation :

Lorsque le cross-linking est terminé, la membrane est placée dans un tube à hybridation contenant un tampon d'hybridation le « DIG Easy hybridation buffer » fourni par la société *Roche-Diagnostic*. Ce tube d'hybridation est placé à 42°C pendant 1 h sous agitation dans un four à hybridation, c'est l'étape de pré-hybridation. Pendant ce temps on dénature l'échantillon d'ADN marqué à 98°C pendant 10 min de façon à le rendre simple brin, pour l'ajouter ensuite au tampon de pré-hybridation, c'est l'étape d'hybridation qui est poursuivie sur toute la nuit.

La concentration des produits PCR marqués, variable d'une PCR à l'autre, doit être évaluée préalablement (cf partie résultats) afin de se placer, lors de l'hybridation, dans des concentrations en ADN marqué, similaires d'un échantillon à l'autre..

IV . 3.6 – Lavage et immunorévélation des membranes :

Deux lavages successifs permettent d'éliminer l'ADN marqué en excès dans un premier temps puis dans un deuxième temps de deshybrider les duplex ADN/ ADN dont les séquences ne sont pas parfaitement complémentaires. En diminuant la concentration en sel du tampon SSC (SSC 20X : NaCl 3M, Sodium citrate 3M, pH 7,0) et en augmentant la température les lavages deviennent de plus en plus stringents. Selon les recommandations de la société Roche deux bains successifs ont été utilisés pour le lavage des membranes :

- 1 – Tampon 2X SSC + 0,1% SDS. T°C ambiante sous agitation pendant 15 minutes.
- 2 – Tampon 0,5X SSC + 0,1% SDS. T°C ambiante sous agitation pendant 15 minutes.

Les membranes sont ensuite plongées 5 minutes dans un tampon A (acide maléique 0,1 M, NaCl 0,15 M ; pH 7.5) auquel on a ajouté 0,3% (V/V) de Tween 20 puis saturées pendant 1h sous agitation dans du tampon A contenant un agent bloquant commercialisé par la

société *Roche-Diagnostic*. L'anticorps anti digoxygénine est alors ajouté à la concentration finale de 75 mU/ml et les membranes incubées sous agitation et à température ambiante 1h supplémentaire. Après trois lavages successifs de 15 min chacun en tampon A plus 0.3% (V/V) de Tween 20, les membranes sont équilibrées 3 min dans un tampon pour substrat (Tris HCL 0,1 M, NaCl 0,1 M ; pH 9, 50).

Détection des hybridation par colorimétrie (NBT/BCIP) :

Les membranes sont incubées à l'obscurité dans le tampon pour substrat additionné de substrat NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride : 75 mg/mL) puis de substrat BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt : 50mg/mL). Ensembles ces deux substrats vont réagir avec la phosphatase alcaline et produire un précipité insoluble violet. L'incubation dure trois heures au cours de laquelle vont apparaître les spots de couleur violette sur la membrane à l'endroit où il y a eu hybridation. La réaction enzymatique est stoppée à l'eau courante.

Détection des hybridation par chemiluminescence (CSPD) :

Le CSPD :

(Disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'(5' chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl) phenyl phosphate, produit un signal luminescent lorsqu'il est dégradé par la phosphatase alcaline, laquelle déphosphoryle le substrat et produit des anions qui finalement se décomposent. Il en résulte une émission de lumière.

Les membranes sont disposées sur une feuille d'acétate transparente, elle-même positionnée dans une cassette de révélation radiographique. Pour chaque cm² de membrane, 10 µL de substrat CSPD dilué au 1/100^e sont appliqués. Immédiatement les membranes sont recouvertes par une seconde feuille d'acétate, en éliminant les éventuelles bulles d'air. Une première incubation est réalisée à température ambiante pendant 5 minutes. Puis la cassette est refermée et placée à 37°C pour une incubation de 15 minutes permettant d'activer la réaction chemiluminescente avec le substrat CSPD. La détection des hybridations se fait par exposition d'un film photographique sur les membranes disposées entre les deux feuilles d'acétates. L'exposition dure entre 20 et 30 minutes cassette fermée. Le film est révélé dans un bain de révélateur constitué de X, suivie d'une fixation dans un bain fixateur constitué de X. Entre la révélation et la fixation, le film est rincé à l'eau courante.



Injection au niveau du muscle adducteur.



Triplicat d'aquarium pour tester une condition expérimentale.

V – Infections expérimentales :

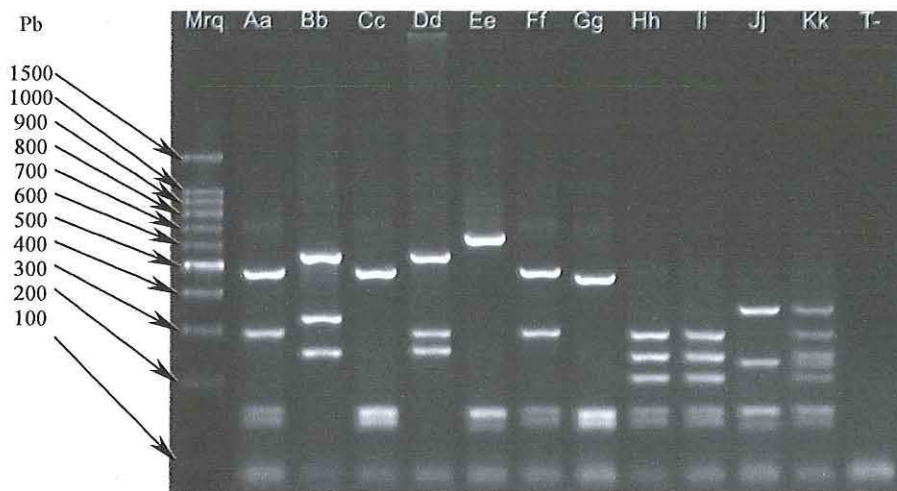
Des huîtres triploïdes de 18 mois ont été anesthésiées dans un bain de chlorure de magnésium puis injectées au niveau de leur muscle adducteur (*voir photo page ci-contre*) avec $2-3 \cdot 10^7$ CFU provenant de cultures bactériennes de souches pures obtenues en milieu Zobell après une nuit d'incubation à 20°C. La concentration de chaque suspension bactérienne utilisée a été déterminée par la méthode de dilution successive d'un bouillon bactérien qui consiste en l'étalement sur boîte de Petri d'une dilution déterminée puis en la numération du nombre de colonies obtenues après incubation des boîtes une nuit à 20°C. Une fois injectées, les huîtres ont été placées dans des aquariums remplis avec 2L d'eau de mer filtrée à 2 µm, équipés d'un bulleur et thermo-régulés à 20°C, à raison de 12 huîtres par aquarium (*voir photo page ci-contre*). Des triplicats ont été réalisés pour chaque condition. Les mortalités ont été relevées quotidiennement, 2 fois par jour, pendant une semaine et les animaux morts retirés de l'aquarium pour être ensuite détruits à l'autoclave.

TROISIÈME CHAPITRE

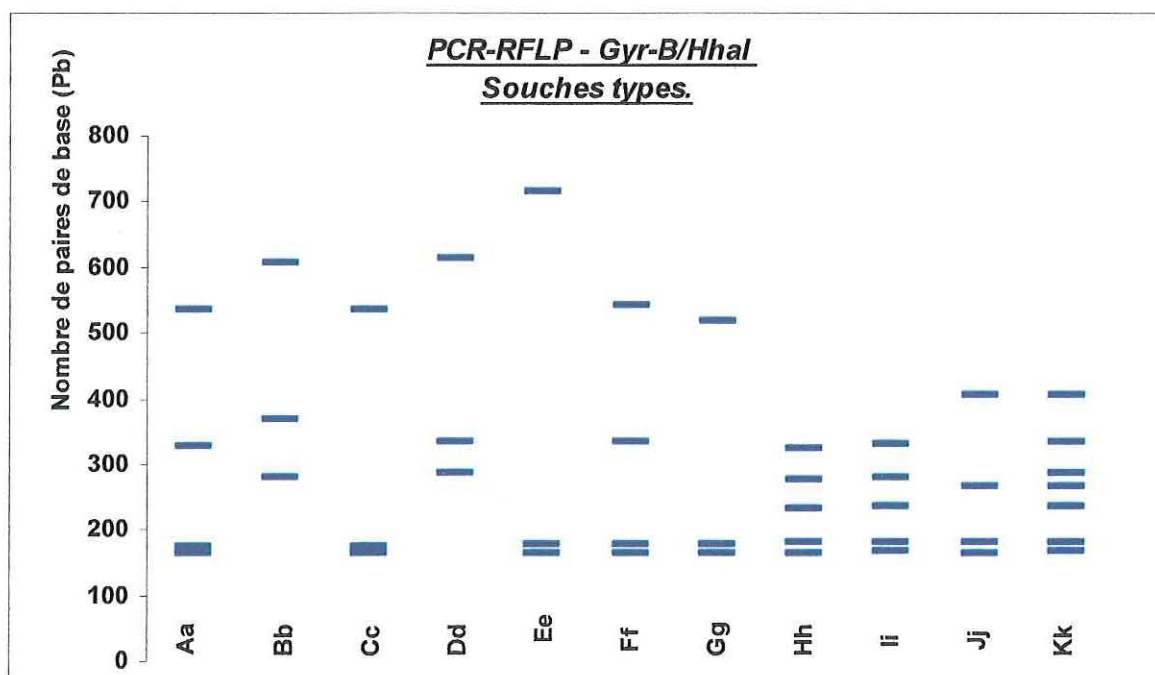
RÉSULTATS

Espèces	Souches	Dénomination
<i>V. splendidus</i>	LMG 4042 ^T	Aa
<i>V. chagasii</i>	LMG 21353 ^T	Bb
<i>V. tasmaniensis</i>	LMG 20012 ^T	Cc
<i>V. pomeroyi</i>	LMG 20537 ^T	Dd
<i>V. kanaloae</i>	LMG 20539 ^T	Ee
<i>V. cyclitrophicus</i>	LMG 21359 ^T	Ff
<i>V. lentus</i>	CIP 107166 ^T	Gg
<i>V. crassostreae</i>	LGP 7 ^T	Hh
<i>V. gigantis</i>	LGP 13 ^T	Ii
<i>V. fortis</i>	LMG 21557 ^T	Jj
<i>V. pelagius</i>	LMG 3897 ^T	Kk

Liste des souches types apparentées à *Vibrio splendidus*.



Photographie du gel d'électrophorèse de la PCR-RFLP-*gyrB/HhaI* des souches types



I – Structuration génétique de souches de Vibrios et étude de pathogénéité:

I.1 – Typage des souches par PCR-RFLP/*gyrB/HhaI* :

L'étude et la caractérisation des différentes souches bactériennes étudiées lors de ce stage passe par un travail d'organisation et d'agencement de ces souches, permettant finalement de les regrouper entre elles selon les analogies et différences mises en évidence à l'échelle de la taxonomie moléculaire. Pour atteindre cet objectif, nous avons appliqué la technique de la PCR-RFLP en se basant sur l'étude des fragments de restriction du gène *gyrB* obtenus par digestion avec l'enzyme *HhaI*. Les différents profils génotypiques obtenus pour l'ensemble des souches étudiées ont ensuite été comparés entre eux et avec ceux obtenus pour des souches types d'espèces apparentées à *Vibrio splendidus*, afin de regrouper les souches possédant des profils identiques et de commencer à hiérarchiser celles-ci au sein de l'arbre phylogénétique des souches apparentées à *Vibrio splendidus*.

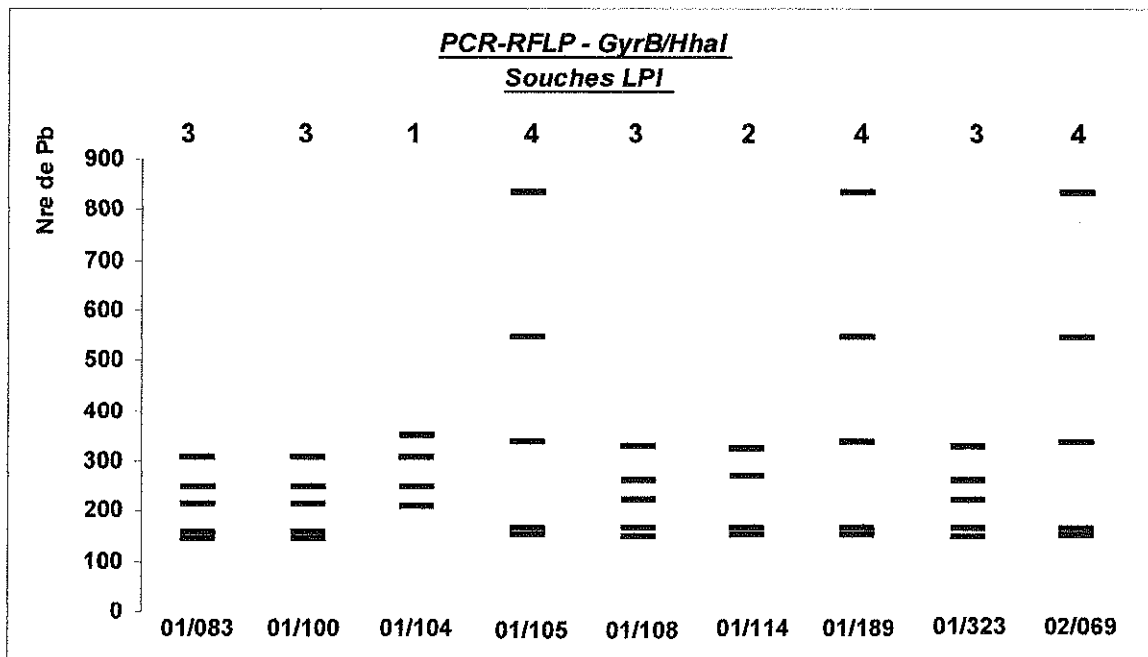
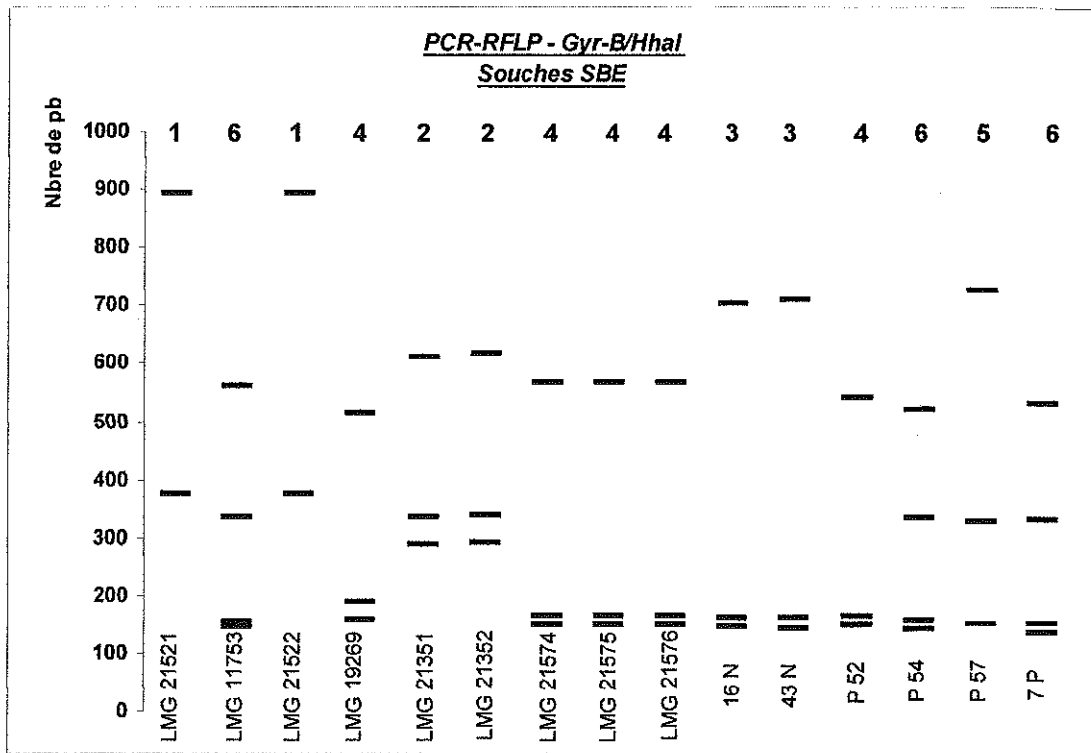
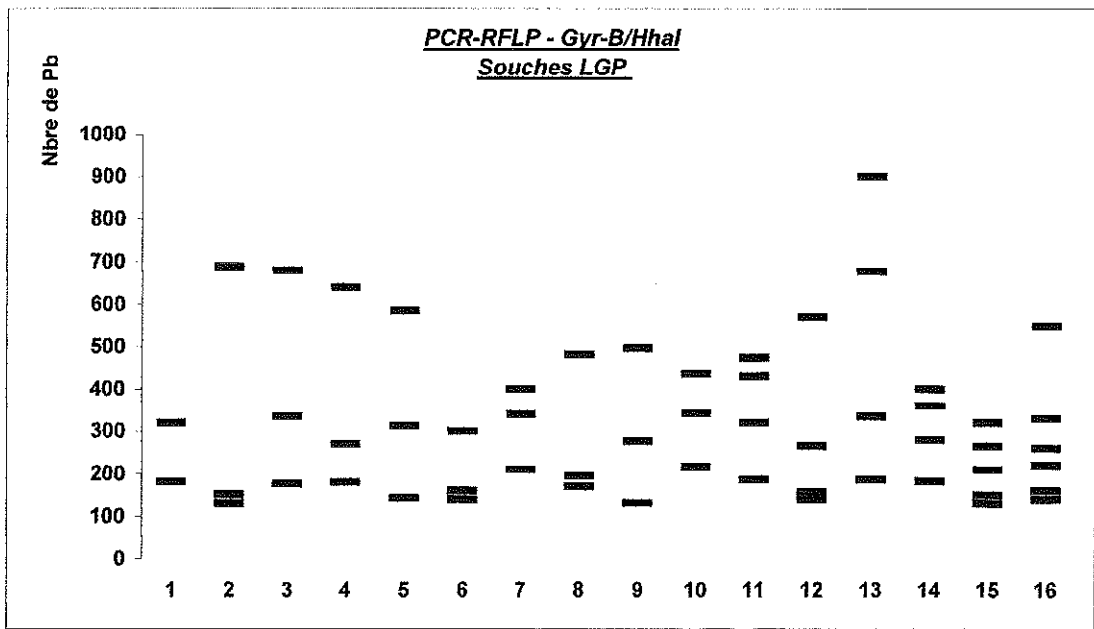
I.1.1 – Profils RFLP/*gyrB/HhaI* des souches types :

Les différentes souches types apparentées à *Vibrio splendidus* utilisées dans cette étude sont répertoriées dans le tableau ci-contre. Les produits de digestion *gyrB/HhaI* pour l'ensemble de ces souches types sont visualisés par migration électrophorétique sur gel d'agarose à 2%. Voir photographie du gel ci-contre. Ce gel a été analysé par un logiciel de traitement d'image Scionimage version 1.01 (de chez Scion corporation). Celui-ci permet de déterminer la taille en nombre de paire de bases de chaque fragment de restriction en se basant sur le profil de migration d'un marqueur de taille disponible commercialement (DNA Ladder 100 bp de chez Promega) dont la taille de chacune des bandes de migration est connue (voir photo du gel page ci-contre).

On peut donc modéliser un profil *gyrB* pour chaque souche type, en reportant dans un graphique les différents fragments de restriction générés par l'enzyme en fonction de leur taille calculée, exprimée en paires de base (voir graphique page ci-contre). Pour la suite de cette étude, les différents gels d'électrophorèse ont été représentés de cette manière afin de rendre la lecture plus simple et plus concise.

⇒ Observations :

Le profilage RFLP *gyrB/HhaI* des souches types a donné lieu à un profil caractéristique (on peut parler aussi de génotype) pour chacune d'entre elles. Parmi les onze génotypes obtenus, huit sont spécifiques d'une souche type. Les trois génotypes restant



définissent des paires de souches types Aa = Ff, Cc = Gg, ainsi que Hh = Ii. Tous ces profils obtenus sur ces souches types d'espèces de *Vibrio* ont servi de référence pour le criblage des souches étudiées.

I.1.2 – Profils RFLP/*gyrB*/*HhaI* des souches étudiées :

Toutes ces souches ont été typées dans les mêmes conditions que les précédentes souches types, ce qui a permis de générer des profils RFLP caractéristiques présentés dans chacun des *trois graphiques, page ci-contre*.

⇒ Observations :

L'analyse des profils des 115 souches de la collection LGP de La Tremblade a permis de définir 16 génotypes distincts. Il n'a pas été possible d'assigner un génotype aux souches 29 et 62 du fait du trop grand nombre de produits visualisés sur gel et d'une digestion partielle des amplicons *gyrB* (données non présentées). Les souches partageant le même génotype sont présentées dans le tableau au verso. L'analyse comparée des profils pour les 15 souches du souchier belge et espagnol (SBE), permet de mettre en évidence 6 génotypes comprenant les souches LMG 21521 et 21522 (génotype SBE1), LMG 21351 et 21352 (SBE2) ; 16N et 43N (SBE3) ; LMG 21574, 21575, 21576, 19269 et P52 (SBE4). P57 (SBE5) et P54, 7P et LMG 11753 (SBE6).

Enfin 4 génotypes particuliers caractérisent les 9 souches fournies par le LPI du centre IFREMER de Brest : 01/104 (génotype LPI1) ; 01/114 (LPI2). 01/108 et 01/323 (LPI3) ; 01/105, 01/189 et 02/069 (LPI4). Donc au total 26 génotypes ont été mis en évidence pour l'ensemble des souches étudiées.

En mettant en évidence les différences et les analogies entre les profils de ces souches générés par PCR-RFLP, on constitue finalement le premier niveau de structuration des souches de *Vibrios* étudiées. La deuxième étape consiste à comparer ces profils avec ceux des souches types pour commencer à les rapprocher d'une souche apparentée à *Vibrio splendidus*.

I.1.3 – Analyse comparative des profils des souches étudiées avec ceux des souches types :

Des profils d'apparence identique ont été obtenus entre les souches types et une voire plusieurs souches étudiées. Nous avons cependant souhaité confirmer ces résultats en prenant la précaution de faire co-migrer à nouveau les souches semblant partager le même génotype ainsi que le marqueur de taille sur un même gel d'électrophorèse. En effet

Génotype	n° Souches	Nbre de frgts de restriction générés	Profil souche type le plus proche	Confirmation par migration comparative Souches collection / souches types	Nbre de fragments identiques
- Souches collection LGP La Tremblade -					
LGP1	95 113 114	2	non déterminé (ND)		
LGP2	11 31 13 33 15 35	3	Ee	++	3 / 3
LGP3	8 9 14 16		ND		
LGP4	21 27 38		Bb	--	1 / 3
LGP5	34 40		Bb	--	1 / 3
LGP6	61 70 74 63 71 68 73		ND		
LGP7	91 96 92 98 93 99 94 100		ND		
LGP8	101 102 103		Cc / Gg	+ / -	2 / 3 1 bande douteuse
LGP9	22		ND		
LGP10	104		ND		
LGP11	77 79 81 82 83		4	Aa / Ff	--
LGP12	89 90	ND			
LGP13	97 109 105 110 106 111 107 112 108	ND			
LGP14	2	ND			
LGP15	3 24 46 57 5 26 47 58 6 28 48 59 7 30 49 60 10 32 50 64 12 39 51 65 17 41 52 66 18 42 53 67 19 43 54 75 20 44 55 84 23 45 56	5	Hh / li	++	5 / 5
LGP16	76 78 80	6	ND		
- Souches souchier Belge/Espagnole (SBE)-					
SBE1	LMG 21521 LMG 21522	2	ND		
SBE2	LMG 21351 LMG 21352	3	Dd	++	3 / 3
SBE3	16 N 43 N		Ee	++	3 / 3
SBE4	LMG 21574 LMG 21575 LMG 21576		Cc / Gg	++	3 / 3
	LMG 19269			--	1 / 3 2 bandes douteuses
	P 52			++	3 / 3
SBE5	P 57	ND			
SBE6	LMG 11753 P 54	4	Aa / Ff	++	4 / 4
	7P			++	4 / 4
- Souches LPI IFREMER Brest -					
LPI1	01 / 104	4	ND		
LPI2	01 / 114		ND		
LPI3	01 / 083 01 / 100 01 / 108 01 / 323	5	Hh / li	++	3 / 3
	01 / 105 01 / 189 02 / 069		ND		

l'obtention de résultats sur des gels différents et l'éloignement des profils de migration entre souches d'intérêt et marqueur de taille constituent des facteurs générateurs d'imprécisions.

Le tableau page ci-contre est un récapitulatif de l'ensemble de l'étude comparative. Il fait état pour chacune des souches étudiées, du profil de la souche type auquel il s'apparente, lorsque cela est possible. Il indique également si ces résultats ont été confirmés (+) ou non (-) après co-migration des souches présentant un génotype identique lors de la première analyse. La proportion de fragments d'ADN de tailles parfaitement identiques à ceux de la souche type correspondante, est également fournie dans la dernière colonne du tableau.

⇒ Interprétations :

Concernant la collection LGP La Tremblade, 49 souches sur les 115 totales de cette collection ont un génotype identique à une souche type ce qui représente 40% de la collection totale. Cependant ces 40% ne concernent que 2 génotypes parmi les 16 identifiés. Un troisième génotype était suspecté mais celui-ci n'a pas été confirmé par co-migration, on ne peut donc pas le considérer comme valide.

En ce qui concerne les souches SBE, les taux d'identité de profils sont supérieurs puisque le génotypage de 11 souches parmi les 15 analysées est confirmé par co-migration, soit environ 73%. Quatre génotypes spécifiques de souche type sur un total de 6 sont mis en évidence. Enfin 4 souches sur les 9 originaires du LPI (soit 40%) ont été identifiées taxonomiquement par PCR RFLP. Elles appartiennent toutes à un seul 1 génotype sur les 4, mis en évidence dans ce groupe.

Or, si on compare l'ensemble des génotypes entre eux, on constate que l'information dans certains cas se recoupe. En effet, plusieurs génotypes sont finalement considérés identiques car ils correspondent au même profil de souche type confirmé par la co-migration. C'est le cas de LGP2 et de SBE3 qui correspondent au profil de la souche type Ee, et également LGP15 et LPI3 correspondant au profil Hh/li. Donc au final il y a 24 génotypes différents pour la totalité des souches. Et sur l'ensemble de ces génotypes différents, 5 ont été identifiés vis à vis d'une souche type. Il s'agit du génotype LGP2/SBE3 correspondant à (Ee), LGP15/LPI3 (Hh/li), SBE2 (Dd) SBE4 (Cc/Gg) et SBE6 (Aa/Ff).

Il convient également de préciser que les souches SB ont été sélectionnées pour leur appartenance au groupe des *V. splendidus* sur la base des typages effectués par le laboratoire qui nous a fourni ces souches à l'aide de la technique FAFLP (Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism).

Souches	Souches types rapportées par FAFLP	Confirmation par RFLP gyr-B
LMG 21521	V.kanaloae	-
LMG 11753		-
LMG 21522		-
LMG 19269	V.pomeroyi	-
LMG 21351		+
LMG 21352		+
LMG 21574	V.tasmaniensis	+
LMG 21575		+
LMG 21576		+

Tableau représentant les résultats du typage FAFLP versus PCR-RFLP.

La comparaison des résultats (voir tableau page ci-contre). obtenus montre une faible congruence entre les deux techniques de typage AFLP / PCR RFLP, avec seulement 5 résultats sur les 9 qui sont convergents.

I.2 – Séquençage et alignement de séquences :

Nous avons eu recours à la technique du séquençage de gènes conservés des souches étudiées, afin d'identifier des souches apparentées à *V. splendidus*, autres que celles déjà identifiées par l'analyse PCR-RFLP. En effet, cette dernière a permis de révéler un grand nombre de génotypes différents, mais peu ont pu être rapproché de celui d'une souche type. Par la même occasion, ce séquençage devait nous permettre de confirmer si les souches déjà identifiées par PCR-RFLP étaient bien apparentées à *V. splendidus*.

Dans un deuxième temps, l'objectif de ce séquençage a été de tenter d'augmenter le niveau de résolution de l'arbre phylogénétique obtenu pour le gène *gyrB* chez les espèces de Vibrios apparentées à *Vibrio splendidus*, et particulièrement de la branche de l'arbre sur laquelle on retrouve les quatre espèces que l'on ne peut distinguer actuellement par cette méthode (*V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis*, *V. lentus*).

Le choix des gènes séquencés s'est donc orienté vers deux axes. D'une part il fallait un gène permettant de pouvoir hiérarchiser les souches étudiées, en distinguant celles qui sont proches de *Vibrio splendidus*. Pour répondre à cette problématique le gène de la sous unité ribosomique 16S (gène 16S) qui présente un haut niveau de conservation au sein des espèces bactériennes, est le candidat de choix.

D'autre part, une fois cette hiérarchisation effectuée il fallait caractériser chacune de ces souches proches de *Vibrio splendidus* en se basant sur le gène *gyrB*, plus polymorphe que le gène 16S, capable de permettre l'identification des espèces apparentées à *Vibrio splendidus* telles que *V. chagasii*, *V. splendidus*, *V. cyclitrophicus*, *V. crassostreae* et *V. gigantis* du fait de la bonne congruence entre la méthode de typage par hybridation ADN/ADN et la phylogénie *gyrB*. L'analyse phylogénétique sur le gène *gyrB* devait nous permettre *in fine* de sélectionner les souches proches des espèces *V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis*, *V. lentus* voire de nouvelles espèces.

Tableau 1

Génotype	n° Souches	Séquences
Collection LGP La Tremblade		
1	95	
	113	@
2	11	@
	31	@
3	8	
	16	
4	21	
	38	@
5	34	
	40	@
6	61	
	74	@
7	91	
	100	
8	101	@
	103	@
9	22	@
10	104	@
11	77	@
	83	@
12	89	
	90	
13	97	
	112	
14	2	@
15	23	
16	76	
	80	@
	62	@
	29	
Souches SBE		
1	LMG 21521	@
2	LMG 21351	
3	16 N	
	43 N	
4	LMG 21575	
	LMG 19269	
	P 52	
5	P 57	@
6	LMG 11753	@
	P 54	
	7P	@
LGP + SBE		19 souche conservées (@)
LPI		8 souches déjà séquencées en 16S
Totale		27 souches pour construire l'arbre 16S

Tableau 2

Souches vibrios apparentées à <i>V. splendidus</i>		Souches vibrios éloignées de <i>V. splendidus</i>	
espèce	nom souche	espèce	nom souche
<i>V. crassostrea</i>	crasso7	<i>V. aesturianus</i>	aestu01032, aestu01031, aestu03015
<i>V. gigantis</i>	Gigan13	<i>V. logei</i>	logeiSR181
<i>V. lentus</i>	len107166	<i>V. fischeri</i>	fischeriS11E
<i>V. tasmaniensis</i>	tasm20012	<i>V. gallicus</i>	gallicus107866
<i>V. pomeroyi</i>	pome20537	<i>V. anguillarum</i>	anguilS0106231
<i>V. chagasii</i>	chag21353	<i>V. harveyi</i>	harveyi UQM2849
<i>V. splendidus</i>	Splen 4042	<i>V. harveyi</i>	harveyiOVL9952331
<i>V. cyclotrophicus</i>	Cycl 21359	<i>V. shilonii</i>	shiloniiW2
<i>V. kanaloae</i>	Kana 20539	<i>Shewanella colwenallia</i>	Shewacolwelliana
		<i>Shewanella afinis</i>	Shewaffinis

I.2.1 – Séquençage de l'ADNr 16S :

Le séquençage étant une technique dispendieuse en temps et en réactifs, le gène 16S a été séquençé pour une, voire deux souches de chacun des génotypes identifiés par PCR-RFLP (voir *tableau 1 page ci-contre*). D'autres séquences étaient déjà disponibles, soit parce qu'elles nous ont été transmises, comme par exemple la totalité des souches provenant du LPI de Brest, soit parce qu'elles ont été déjà déposées dans une banque de données (GenBank). C'est le cas notamment de toutes les souches type apparentées à *V. splendidus* (*V. tasmaniensis*, *V. crassostreae*, *V. gigantis*, *V. chagasii*, *V. cyclotrophicus*, *V. splendidus*, *V. kanaloae* et *V. pomeroyi*) ou pour les autres espèces de *Vibrio* (*V. aestuarianus*, *V. anguillarum*, *V. shilonii*, *V. harveyi*, *V. fisheri*) (voir *tableau 2 ci-contre*). Toutes ces souches déjà disponibles n'ont donc pas nécessité de travaux de séquençage du gène 16S.

Le gène 16S étant un gène hautement conservé, l'analyse phylogénétique a porté sur un maximum de sites nucléotidiques. La totalité de la séquence du produit généré par PCR a été obtenue par un double séquençage en 5' (amorce sens) et 3' (amorce antisens) de l'amplicon. Après alignement des séquences de chaque souche d'intérêt, une première analyse phylogénétique a porté sur 854 sites nucléotidiques excluant les gaps (décalages) générés par l'alignement (*une liste de ces souches signalées par le symbole @ figure sur le tableau 1 page ci-contre*). Il n'a pas été possible cependant de traiter certaines souches car leur séquence était de trop mauvaise qualité pour être analysable en phylogénie : soit les séquences totales sens et antisens (*cellule couleur grise du tableau 1*) soit la séquence antisens uniquement (*cellule couleur verte*). Une deuxième analyse phylogénétique a donc été entreprise sur un nombre de sites plus restreint (totalisant 471 sites hors gaps) portant uniquement cette fois sur les séquences sens, incluant donc les souches indiquées (*cellules couleur verte*).

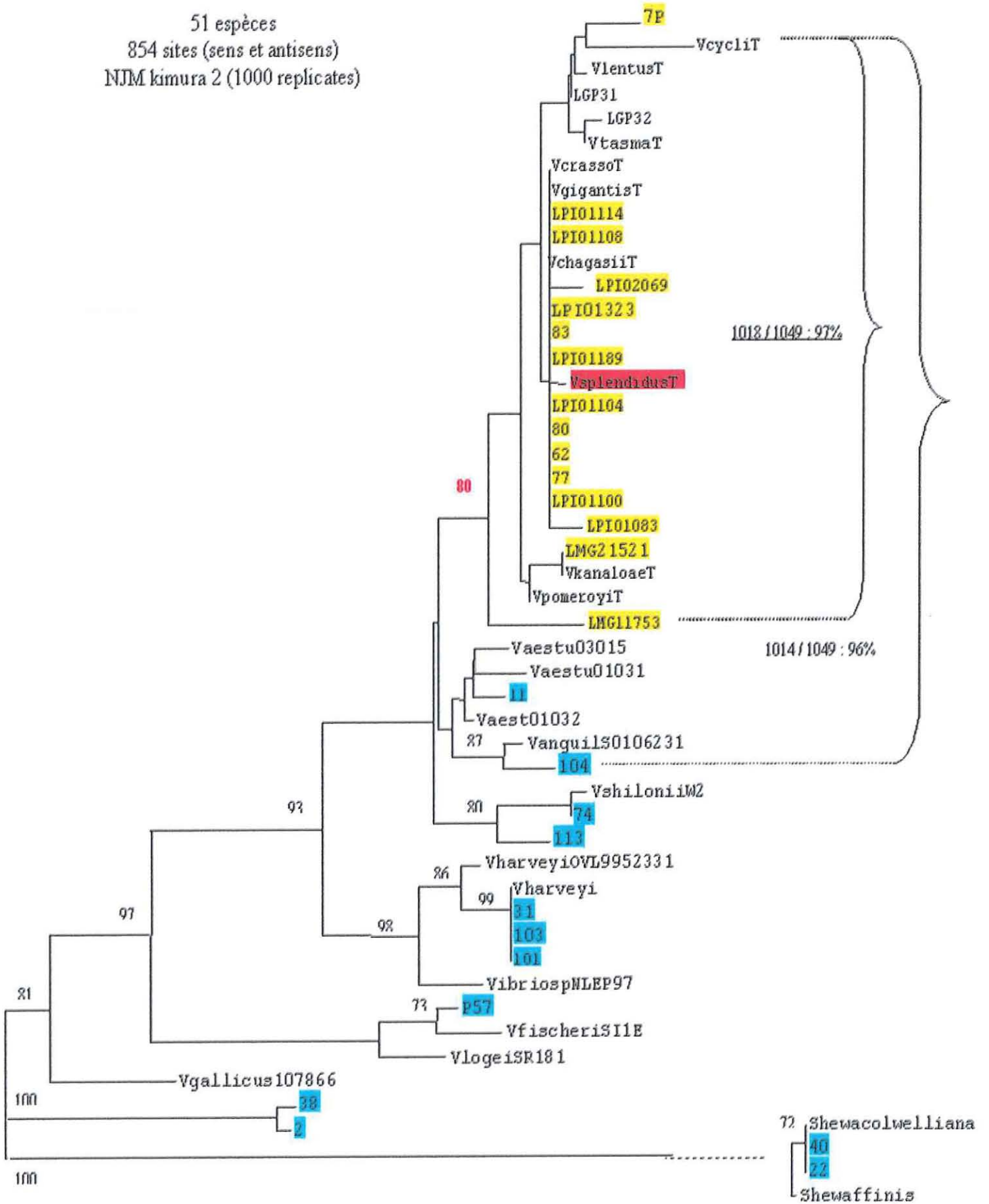
⇒ Interprétation de l'arbre 16S sur 854 sites. Voir figure page suivante :

Ce premier arbre totalise 51 séquences 16S de *Vibrios* dont 27 appartiennent aux souches étudiées, et 8 aux souches type de *Vibrio* apparentés à *V. splendidus*. Quinze souches sont trouvées dans le groupe polyphylétique des *Vibrio splendidus*. Il s'agit des souches 62, 77, 80, 83, LMG 21521, LMG 11753, 7P, 01/083, 01/100, 01/104, 01/108, 01/114, 01/189, 01/323, 02/069, surlignées en jaune dans l'arbre. Cet embranchement est défini par une valeur élevée de robustesse « bootstrap » de 80% ce qui atteste de la fiabilité

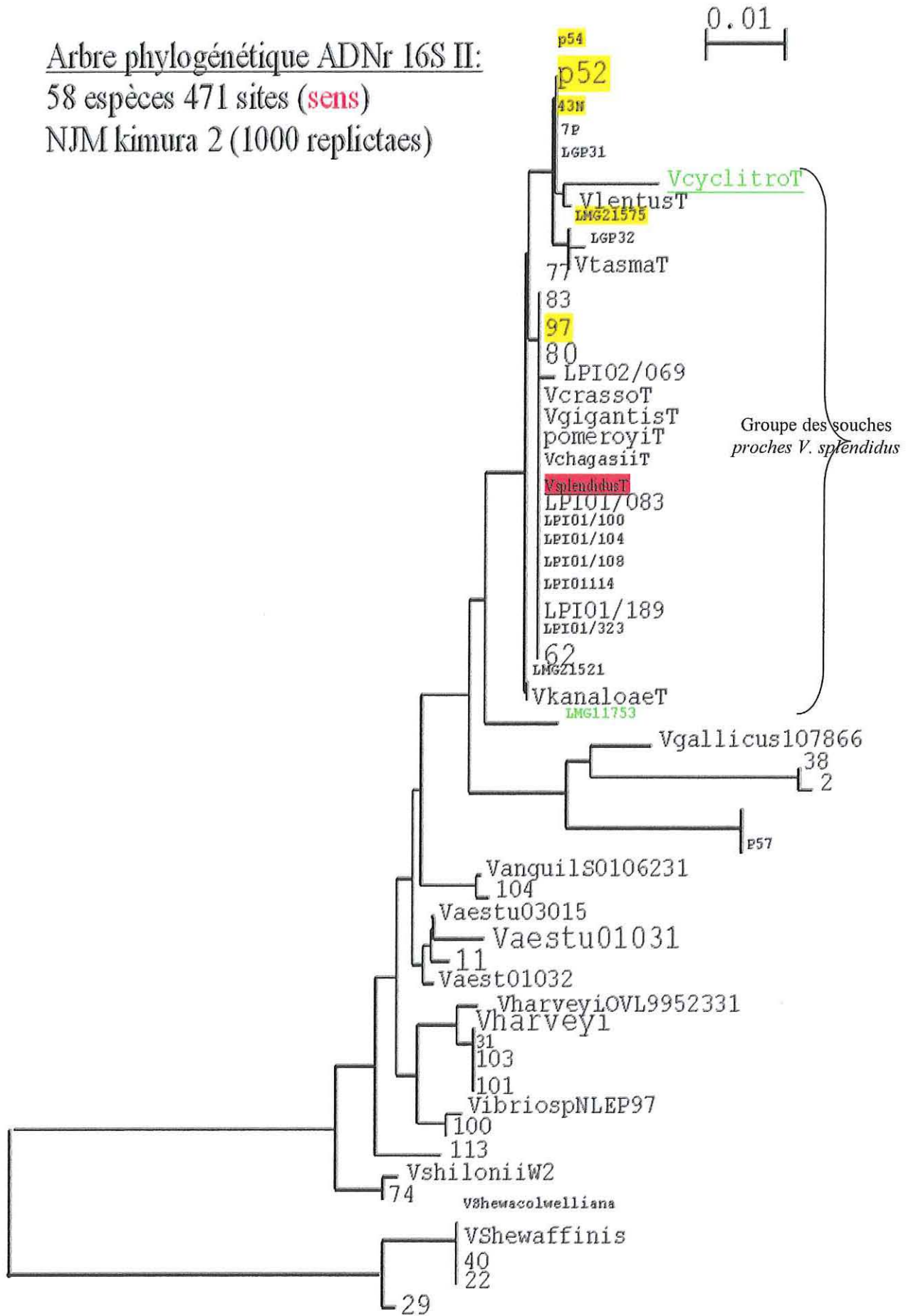
Arbre phylogénétique ADNr 16S :

0.01

51 espèces
854 sites (sens et antisens)
NJM kimura 2 (1000 replicates)



Arbre phylogénétique ADNr 16S II:
58 espèces 471 sites (**sens**)
NJM kimura 2 (1000 replicates)



de cette construction phylogénétique. On observe moins de 3 % de polymorphisme de séquence pour les souches le constituant. L'espèce de *Vibrio* la plus proche de ce groupe polyphylétique est *V. aestuarianus*.

Les autres souches de cette étude sont figurées en bleu sur l'arbre et sont retrouvées proches phylogénétiquement des autres espèces de *Vibrio* telles *V. aestuarianus* (souche 11), *V. anguillarum* (104), *V. shilonii* (74 et 113), *V. harveyi* (31, 103, 101) *V. fisheri* (P57).

De façon inattendue certaines souches ne sont pas des *Vibrio* mais appartiennent à un autre genre, *Shewanella* et sont proches des espèces *Shewanella colwenallia* et *Shewanella afinis*. Il s'agit en particulier des souches 40 et 22.

⇒ Interprétation de l'arbre 16S 471 sites. Voir figure page ci-contre :

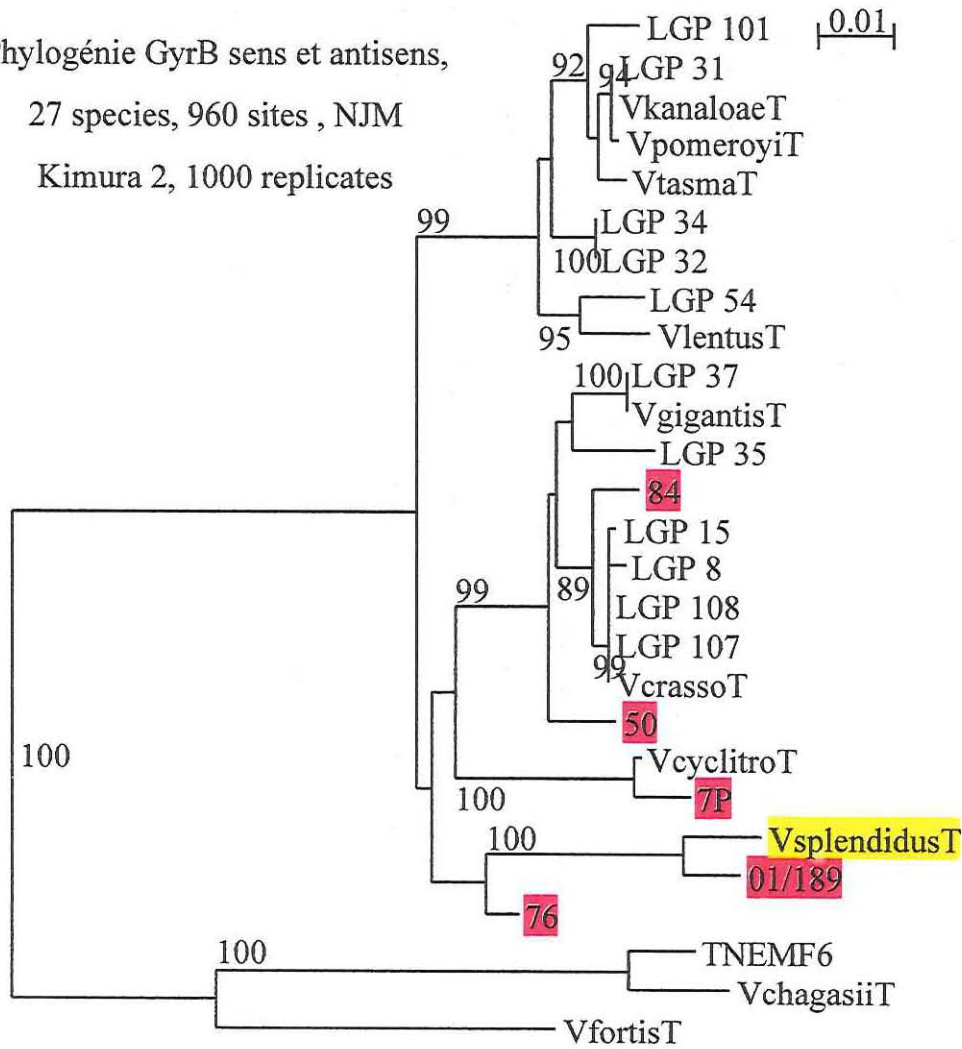
Ce deuxième arbre totalise 58 séquences 16S de *Vibrios*. La typologie reste inchangée par rapport au précédent arbre en ce qui concerne les espèces apparentées à *V. splendidus*. Les 15 souches précédentes sont retrouvées dans ce groupe polyphylétique qui comprend désormais 5 nouvelles souches pour lesquelles le séquençage du gène 16S n'a fourni de résultats qu'avec l'amorce sens. Il s'agit des souches P54, P52, 43N, LMG21575 et 97 (surlignées en jaune dans l'arbre).

1.2.2 – Séquençage du gène *gyrB* :

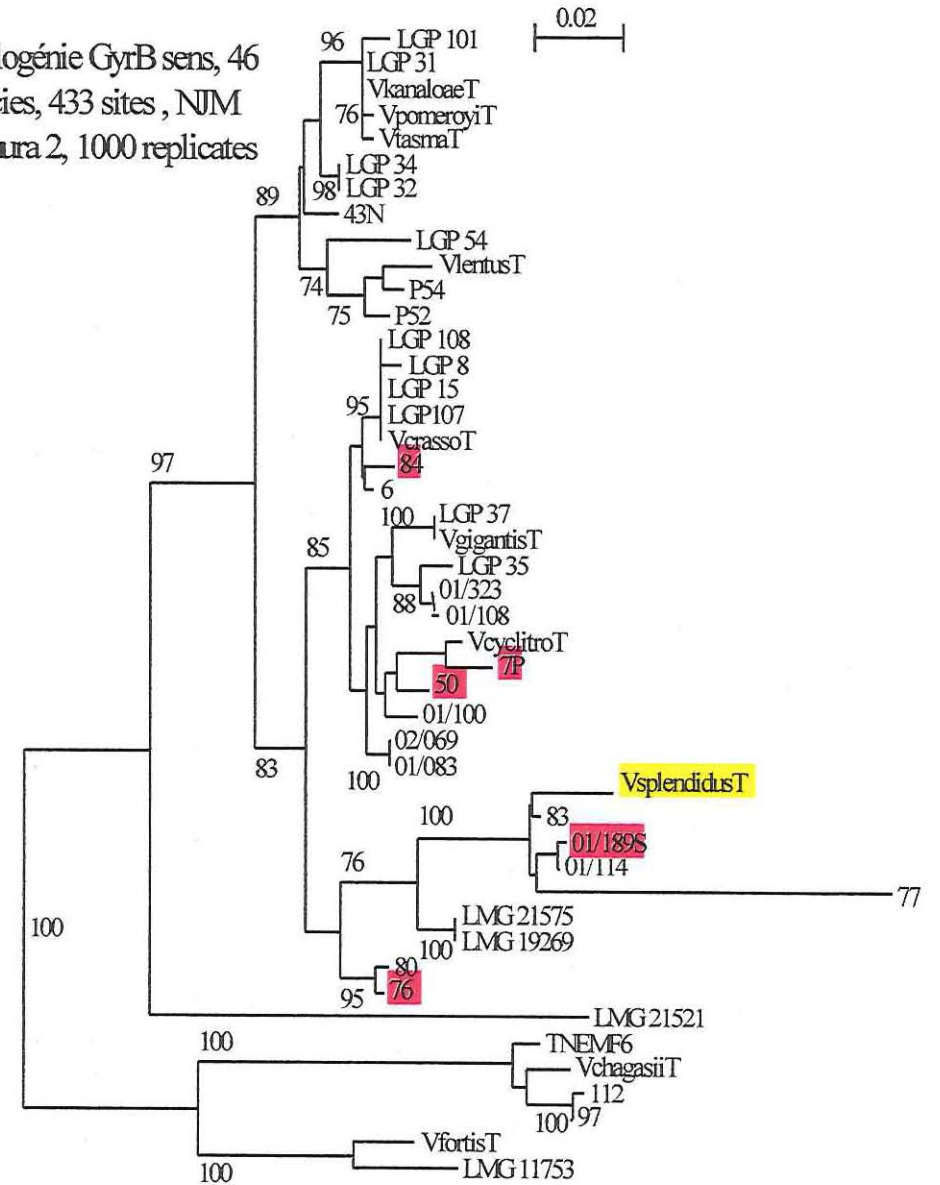
A – Sélection des souches à étudier en séquençage du gène *gyrB* :

Au total ce sont 20 souches apparentées à *V. splendidus*, sur la base des résultats obtenus en phylogénie 16S, qui ont été pré-sélectionnées afin de tenter de préciser la phylogénie sur le gène *gyrB* des espèces proches de *V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis* et *V. lentus*. Les souches de la collection du LGP retenues appartiennent aux génotypes LGP11, LGP13 et LGP16 déduits de l'analyse par PCR-RFLP. Celles issues des souchiers belges et espagnoles correspondent aux génotypes SEB1, SEB3, SEB4 et SEB6. De ce fait, d'autres souches non séquencées pour leur 16S mais appartenant à ces différents génotypes ont été ajoutées à ces 20 premières souches. Il s'agit des souches 112 (génotype LGP 13), 76 et 80 (génotype LGP 16), 16N (génotype SBE 3), LMG19269 (génotype SBE 4). Enfin les souches 50 et 84 appartenant au génotype LGP15 ont également été analysées du fait de profils obtenus en PCR-RFLP rigoureusement identiques aux souches types des espèces *V. crassostreae* ou *V. gigantis* appartenant toutes deux au groupe polyphylétique des *V. splendidus*.

Phylogénie GyrB sens et antisens,
27 species, 960 sites , NJM
Kimura 2, 1000 replicates



Phylogénie GyrB sens, 46
species, 433 sites , NJM
Kimura 2, 1000 replicates



En définitive se sont donc 27 souches qui ont été sélectionnées, elles sont présentées dans le tableau page ci-dessous.

	Génotype	Souches sélectionnées
LGP	11	77, 83
	13	97, 112
	15	6, 50, 84
	16	76, 80
		62
SBE	1	LMG 21521
	3	16N, 43N
	4	LMG21575, LMG19269, P52
	6	LMG11753, P54, 7P
LPI	1	01/104
	2	01/114
	3	01/083, 01/100, 01/108, 01/323
	4	01/189, 02/069
	Total	27 souches

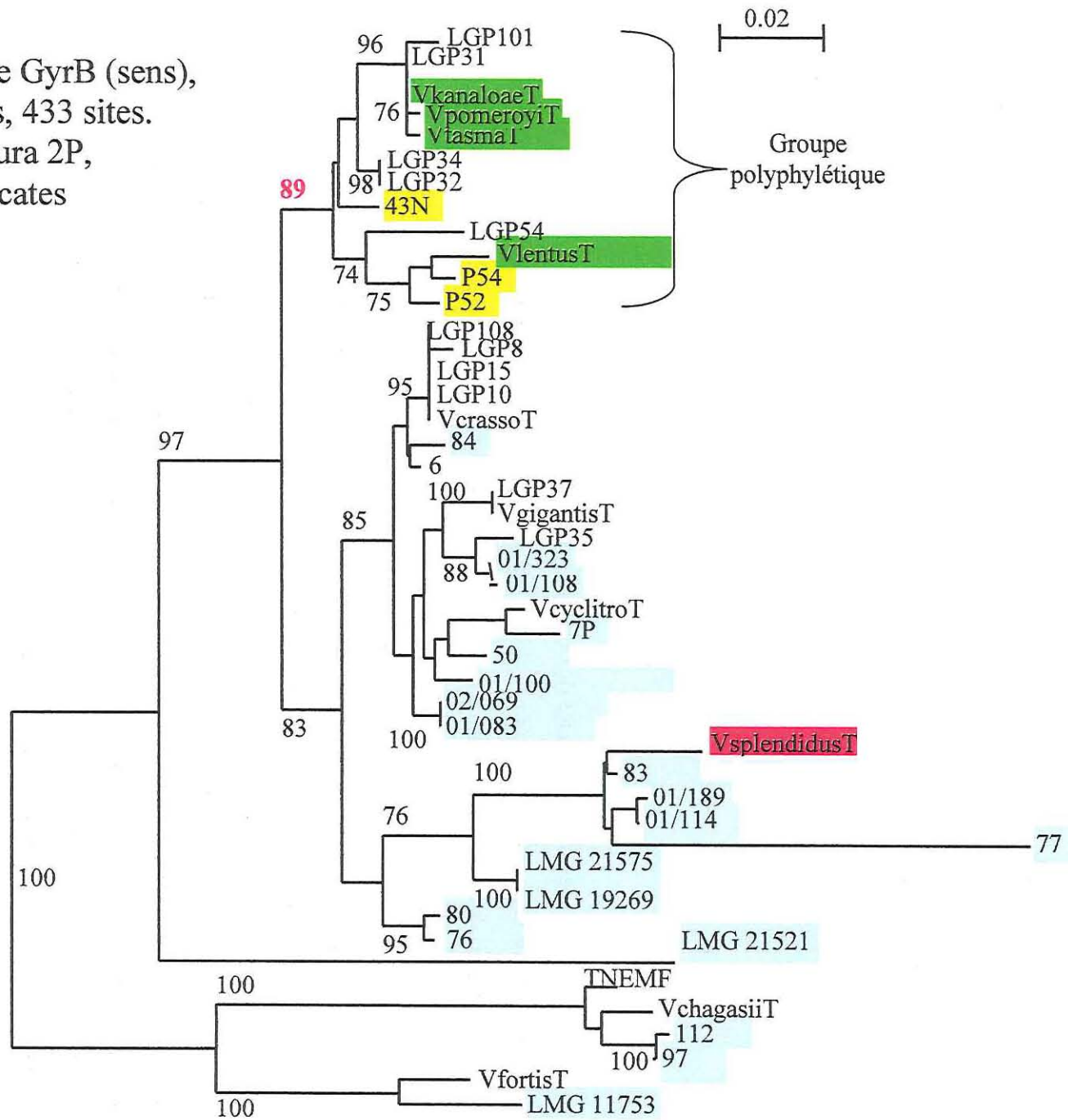
B - comparaison des typologies des arbres *gyrB* sens et *gyrB* total

Comme pour le gène ADNr 16S, nous avons voulu déterminer si la typologie des arbres phylogénétiques déduits des séquences *gyrB* était modifiée en fonction du nombre de sites étudiés ou de leur localisation sur le gène *gyrB*. La réponse à une telle question est en effet d'importance car le séquençage est exigeant en temps et en réactifs onéreux. On a donc comparé les typologies des arbres résultants de l'analyse phylogénique portant, soit sur la totalité de la séquence de l'amplicon *gyrB*, soit sur une séquence partielle obtenue par séquençage à l'aide d'une seule amorce (amorce *gyrB* sens dans notre cas). Dans le premier cas les séquences complètes de 5 des 27 souches d'intérêt phylogénétique sélectionnées ont été obtenues. Dans le deuxième cas ce sont les séquences partielles des 27 souches sélectionnées qui ont été recherchées en utilisant uniquement l'amorce sens. Du fait de problèmes survenus lors du séquençage du gène *gyrB* de trois souches (16N, 62 et 01/104) seules 24 séquences ont pu être analysées en définitive.

⇒ Interprétations. Voir figure page ci-contre :

En comparant ces deux arbres, on peut observer qu'il n'y a pas de différence significative sur le positionnement des 5 souches d'intérêt, communes aux deux arbres : 50, 76, 84, 7P et 01/189. A titre d'exemple, la souche 84 se situe dans les deux arbres proche de

Phylogénie GyrB (sens),
 46 espèces, 433 sites.
 NJM Kimura 2P,
 1000 replicates



la souche type *Vibrio crassostreae* (VcrassoT), de même les souches 50 et 7P se positionnent à proximité de la souche type de *Vibrio cyclitrophicus* (VcyclitroT).

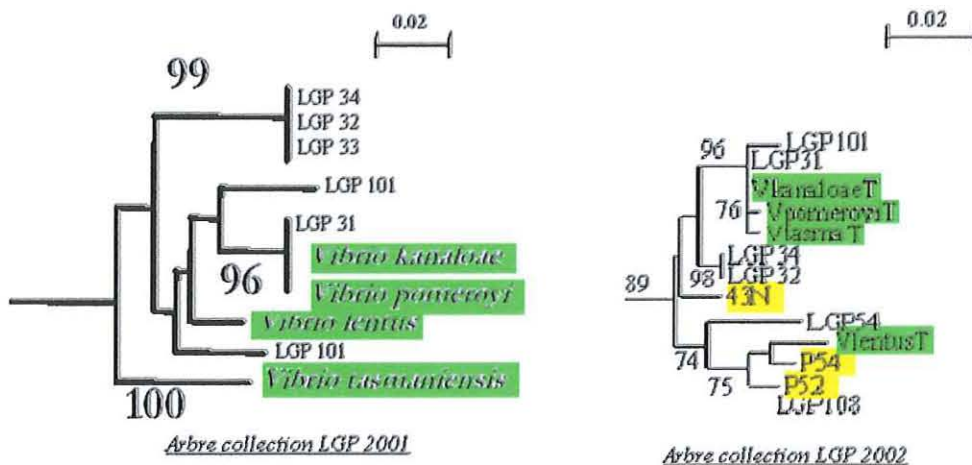
Par conséquent on peut considérer que la séquence 5' du gène *gyrB* obtenue avec l'amorce sens et représentant 433 sites (gaps exclus) est suffisamment informative pour permettre une analyse phylogénétique pertinente.

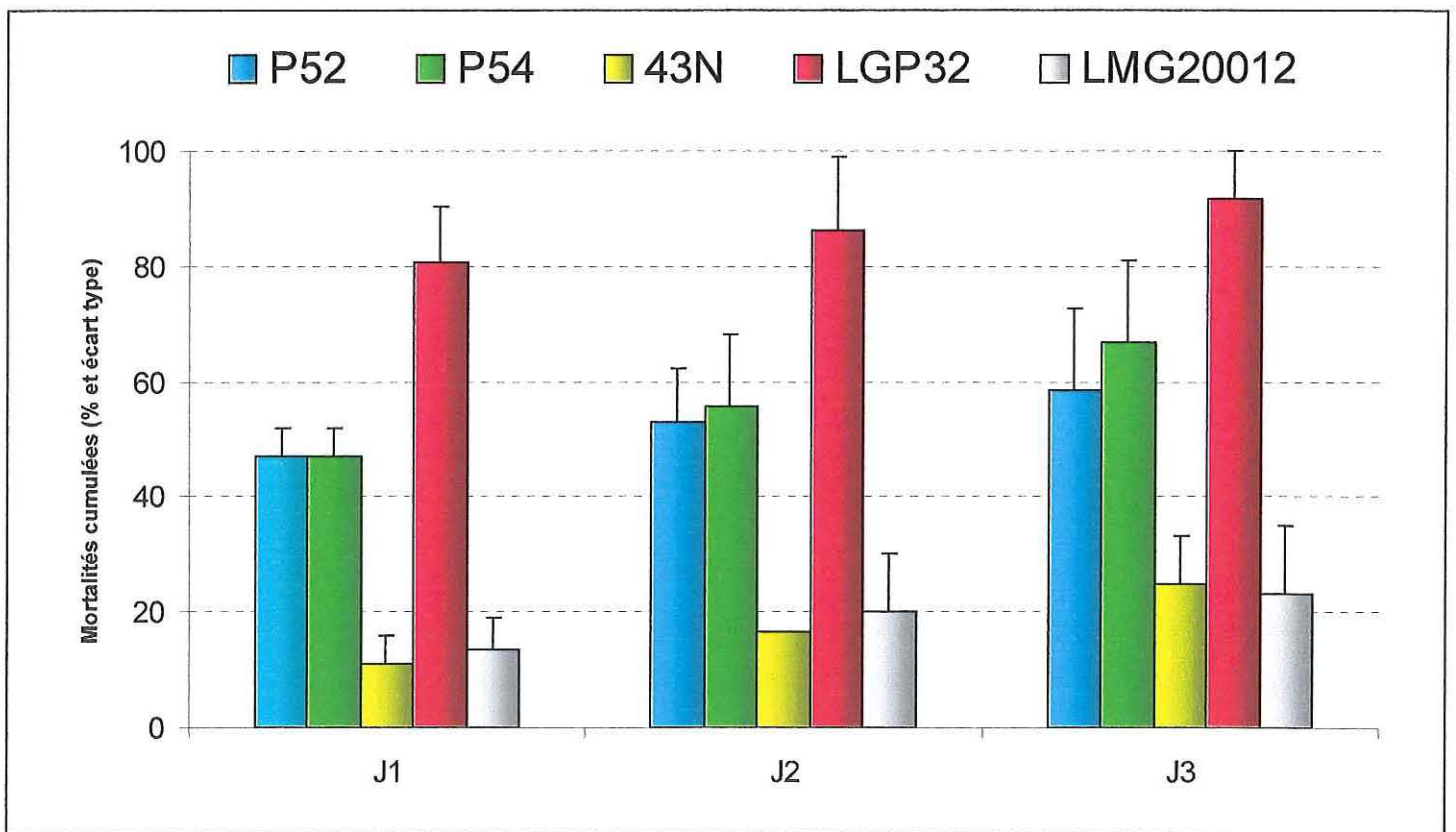
C - Arbre phylogénétique déduit de la séquence 5' du gène *gyrB* :

Les séquences 5' du gène *gyrB* provenant de 46 souches dont 24 sélectionnées lors de cette étude ont permis la construction de l'arbre phylogénétique présenté sur *la figure page ci-contre*.

⇒ Interprétations :

Depuis le début de cette étude nous avons envisagé la construction d'un tel arbre dans l'objectif d'apporter un degré de précision supplémentaire à la phylogénie des espèces apparentées à *Vibrio splendidus*. On note l'apparition d'un groupe polyphylétique robuste (89% de valeur de bootstrap) dans lequel on retrouve les 4 souches problématiques (*V. kanaloae*, *pomeroyi*, *tasmaniensis*, surligné en vert). Cependant, parmi les 24 souches étudiées qui ont été sélectionnées pour la construction de cette arbre, seulement 3 appartiennent à ce groupe. Il s'agit des souches SE : 43N, P54 et P52. Malgré l'apport de trois souches supplémentaires, on observe également que l'analyse phylogénétique réalisée sur le gène *gyrB* ne permet toujours pas de distinguer clairement les souches type des espèces *V. kanaloae*, *V. pomeroyi* et *V. tasmaniensis*. Par comparaison, on peut montrer la typologie partielle déduite de l'analyse phylogénétique des 125 souches de la collection LGP 2001 établie par Mélanie Gay.





Cinétique de mortalité induite par les souches testées en infection expérimentale.

Entre ces deux arbres on constate que l'organisation de ce groupe n'a pas beaucoup évolué. On peut toutefois remarquer que l'espèce *V. lentus* se démarque davantage des trois autres espèces de *Vibrio*, ce groupe étant soutenu par une forte valeur de robustesse (76%). Ceci est probablement lié au fait que deux des trois souches ajoutés à l'arbre sont des *V. lentus* (P52, P54). De ce fait, on confirme donc les résultats de rybotypage, phénotypage et séquençage 16S réalisé à l'université de Vigo (voir tableau souches étudiées. Matériels et méthodes).

I. 3 – Pouvoir pathogène des souches

Certaines souches apparentées à *Vibrio splendidus* telles LGP 32 et LGP 31 sont pathogènes pour l'huître creuse *C. gigas* en infection expérimentale en provoquant la mort des individus, tandis que d'autres, telle la souche type de *V. tasmaniensis*, semblent inoffensives. Nous avons cherché à déterminer le pouvoir pathogène des trois souches 43N, P54 et P52, du fait de leur proximité phylogénétique avec les souches LGP32, LGP31 et la souche type *V. tasmaniensis*.

⇒ Interprétations. Voir graphique page ci-contre :

Ce graphique montre la cinétique des mortalités induite par chacune des souches. Les souches P54 et P52 se révèlent être pathogènes pour les huîtres en condition expérimentale par comparaison aux mortalités induites par la souche LGP32. Par contre, la souche 43N apparaît avirulente avec des taux de mortalité semblables à ceux induits par la souche type *V. tasmaniensis*.

II – Mise au point des macroarrays :

Ce travail a été effectué parallèlement à la structuration génétique des souches de *Vibrios*. La conception des membranes a été réalisée à partir des séquences connues du gène *toxR* chez les souches types de *Vibrios* apparentées à *V. splendidus* (Aa → Ii).

II.1 –choix d'une technique de détection :

Il existe plusieurs techniques de détection des hybrides ADN-ADN. Nous en avons testé deux : la colorimétrie et la chemiluminescence.

La colorimétrie est le système couramment utilisé au LGP pour le criblage de banques soustractives visant à identifier des gènes candidats à la virulence. Il utilise comme substrat le NBT/BCIP. La chemiluminescence utilise le substrat CSPD.

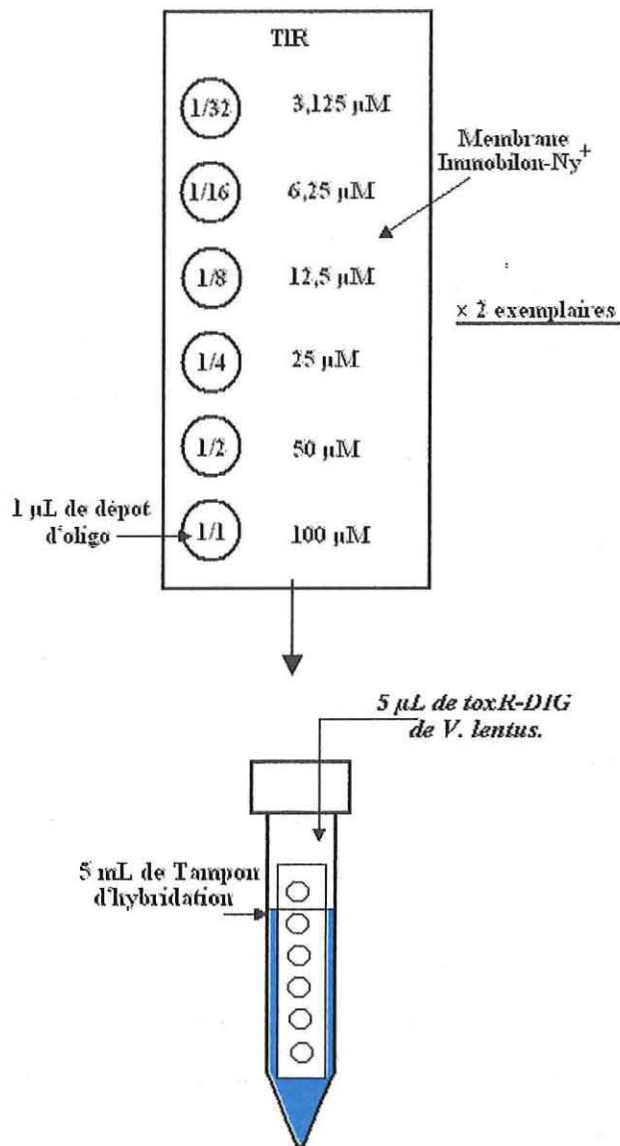
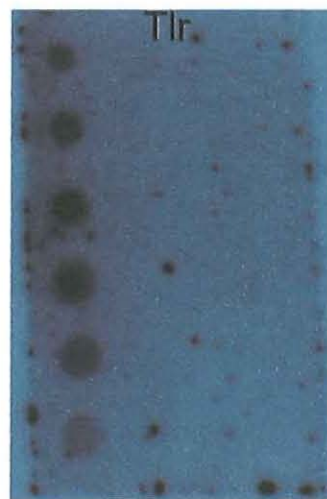


Schéma de l'essai du choix du détection.

Résultats :



Détection
colorimétrique.



Détection par
chemiluminescence.

⇒ Conception des membranes :

Pour les deux systèmes de détection nous avons travaillé avec une des souches types : *V. lentus* choisie arbitrairement parmi les autres souches types. Une gamme de dilution de l'oligonucléotidique correspondant à cette souche (dénomé TIR : voir alignement des séquences pour le design des oligonucléotides. Matériels et méthodes) a été réalisée, puis 1 µl de chacune des dilutions a été déposé sur une membrane de nylon.

Afin de comparer les deux protocoles de révélation basés sur la colorimétrie ou la chemiluminescence, les membranes ont été préparées en duplicat. *Voir schéma page ci-contre.* Toutes les étapes d'hybridation et de lavage des membranes ont été réalisées de façon identique en utilisant notamment le même produit PCR *toxR* marqué à la digoxigénine (*toxR-DIG*) et généré à partir de la souche type de *V. lentus*. Seule l'étape de révélation a été effectuée dans un cas, avec le substrat NBT/BCIP et dans l'autre avec le CSPD. *Voir résultats page ci-contre.*

⇒ Interprétations :

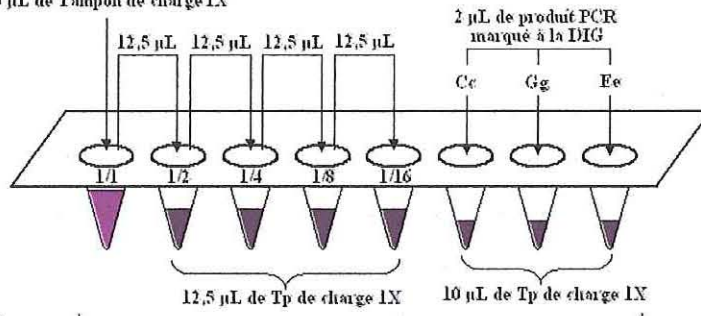
Des signaux d'hybridation ont été obtenus pour les deux techniques de révélation. Ces signaux sont spécifiques des hybrides ADN/ADN puisqu'ils apparaissent préférentiellement aux endroits où de l'ADN cible (TIR) a été déposé et que leur intensité décroît au fur et à mesure que la quantité d'ADN cible déposée sur membrane diminue.

La comparaison des deux méthodes de révélation révèle que la colorimétrie est beaucoup moins sensible que la chemiluminescence. De plus un bruit de fond a été observé en colorimétrie qui se traduit par une coloration uniforme de la membrane en violet pâle. Ce bruit de fond gêne l'interprétation des signaux d'hybridation, particulièrement pour les faibles quantités d'ADN cible déposées sur la membrane car dans ce cas, le signal a tendance à se confondre avec celui-ci. Par la suite le système de détection des hybrides par chemiluminescence a été préféré pour la mise au point des macroarrays en raison de sa plus grande sensibilité par rapport à la technique colorimétrique. De plus ce système est beaucoup moins dispendieux en temps puisque 1 à 2 heures maximum d'incubation avec le substrat suffisent alors que la révélation par colorimétrie nécessite au moins 10 heures.

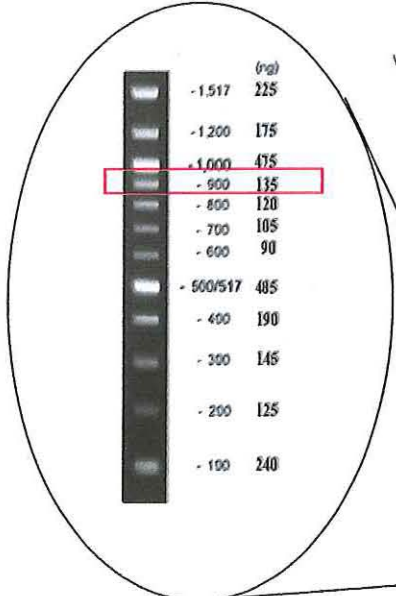
II.2 – Mesures de sensibilité des macroarrays :

La sensibilité des macroarrays a été appréciée en déterminant à la fois, l'effet de la quantité d'ADN cible déposée sur la membrane, et l'effet de la concentration du produit

5 μ L de marqueur de taille
(100 pb New England Biolabs)
+
20 μ L de Tampon de charge 1X



Migration électrophorétique de 5 μ L de chaque puits
sur gel d'agarose 1%



5 μ L soit 2,5 μ g de 100 bp DNA ladder visualisé
sur gel d'agarose 1% dans du tampon TAE.

Mesure de la concentration en Produit PCR *toxR-DIG*.

Concentration en oli pour chaque dépôt

- 1/1000 0,1 μ M
- 1/100 1 μ M
- 1/10 10 μ M
- 1/1 100 μ M

Schéma des membranes

10 μ L de produit PCR *toxR-DIG*

2 mL de tampon d'hybridation

1 mL de Tp

Membrane

Concentration en <i>toxR-DIG</i> (ng/mL)	150	75	37,5	18,8	9,4	4,7	2,4
Volume produit PCR <i>toxR-DIG</i> (μ L/mL de Tp)	5	2,50	1,25	0,63	0,31	0,15	0,07
Facteur de dilution	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64

Essai de sensibilité des macroarrays.

PCR *toxR-DIG* spécifique de l'ADN cible, sur l'intensité du signal d'hybridation. Autrement dit nous avons cherché à savoir dans quelles limites de concentration en oligonucléotide mais aussi en produit *toxR-DIG*, le signal de détection pouvait être considéré comme optimal. Pour mettre en œuvre cet essai, nous avons, dans un premier temps, réalisé une estimation de la concentration du produit PCR *toxR-DIG*, en s'intéressant à trois échantillons différents choisis arbitrairement au sein des souches types apparentées à *V. splendidus*. Il s'agit des souches type *V. lentus* (Gg), *V. tasmaniensis* (Cc) et *V. kanaloae* (Ee).

⇒ Mesure de la concentration en échantillon *toxR* :

Un amplicon *toxR-DIG* a été généré chez ces trois souches, par PCR avec les amorces dégénérées correspondantes (voir matériels et méthodes). Ces amplicons ont été analysés sur gel d'agarose 1% en présence de bromure d'ethidium (BET) en faisant co-migrer une gamme de dilution d'un marqueur de taille dont la concentration de chaque bande est connue (DNA Ladder 100 pb, 500 µg/mL, NewEngland Biolabs). La comparaison de l'intensité des signaux obtenus aux alentours de 900 pb, entre les échantillons et le marqueur de taille a permis de déterminer la concentration des amplicons *toxR-DIG* générés par PCR. *Voir schéma et photo du gel page ci-contre.*

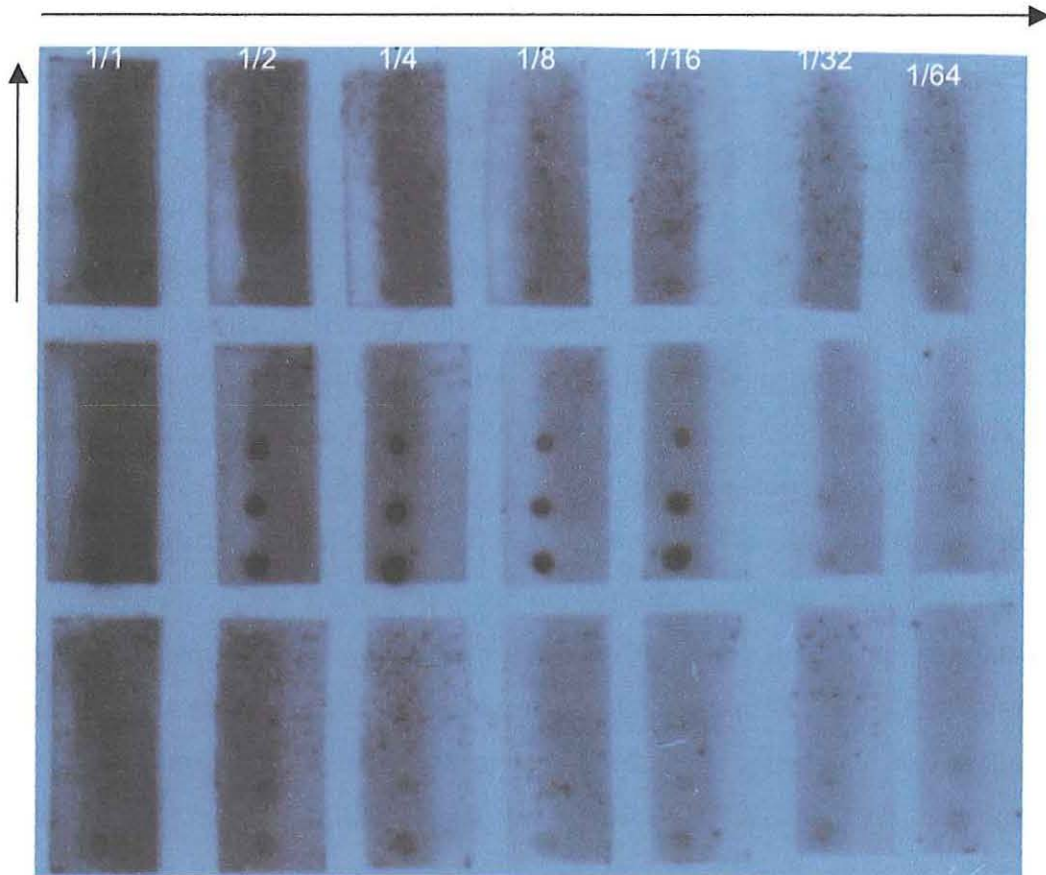
On constate par migration comparative que les trois amplicons correspondant aux trois souches types (Cc, Gg, Ee) ont des concentrations équivalentes et qu'elles présentent la même intensité de marquage au BET que la bande 900 pb du marqueur moléculaire dilué au demi soit 67,5 ng (135/2ng). Le chargement des échantillons dans chaque puit du gel d'électrophorèse ayant nécessité 2 µl, la concentration des produits PCR *toxR-DIG* pour les trois souches est estimée à **30 ng/µL ou encore 30 µg/mL.**

⇒ Conception des membranes :

Pour cet essai de sensibilité, nous avons fait varier, lors d'un même essai, la concentration du produit PCR *toxR-DIG* utilisé lors de l'hybridation ainsi que la quantité d'ADN cible déposé sur la membrane. Les résultats ont été interprétés en évaluant à l'œil nu l'intensité de signaux d'hybridation obtenus. *Voir schéma de l'essai page ci-contre.*

Diminution de la concentration en produit PCR *toxR-DIG*.

Diminution
de la
concentration
en
oligonucléotides.



Film auto-radiographique des membranes de l'essai de sensibilité.

⇒ Interprétations. Voir film auto-radiographiques page ci-contre :

L'examen des films auto radiographiques révèle que les signaux d'hybridation obtenus ne sont pas homogènes selon la souche considérée, à concentration en produit marqué et quantité d'ADN cible égales pour les trois souches. En effet les spots sont bien visibles avec la souche *V. lentus*. A contrario, pour *V. tasmaniensis* et *kanaloae*, on observe un bruit de fond important sur les membranes qui tend à masquer le signal. Lorsque la concentration en produit PCR marqué diminue, on constate que le bruit de fond est moins important, sans affecter pour autant l'intensité du signal d'hybridation. Ainsi on peut diluer de deux en deux le produit PCR marqué jusqu'au 1/16^{ème} sans affecter l'intensité du signal. Ce n'est qu'à partir d'une dilution au 1/32^{ème} (correspondant à 4,7 ng/ml de tampon d'hybridation) que la concentration en produit PCR marqué devient limitante. Quelle que soit la concentration en produit PCR marqué, l'intensité des signaux d'hybridation tend à décroître avec la quantité d'ADN cible déposé sur la membrane. Cependant l'intensité des signaux d'hybridation diffère pour des concentrations d'ADN cible correspondant à 100, 10 et 1 µM. Ce n'est qu'à 0,1 µM (100 nM) que le signal d'hybridation disparaît. On peut donc au vue de ces résultats déterminer que la limite de détection des macroarrays se situe pour l'ADN cible entre 0,1 µM et 1 µM, et pour les produits PCR marqués entre 4,7 et 9 ng/mL de tampon d'hybridation. Cette limite a pu être clairement établie pour le cas de *V. lentus*, mais il a été difficile de le vérifier pour les trois autres souches du fait d'un bruit de fond plus important, gênant l'interprétation des signaux.

Pour la suite des essais de mise au point des macroarrays, nous avons décidé de nous placer à une concentration de produit PCR marqué de 40ng/ml, ce qui apparaît être un bon compromis d'une part entre le bruit de fond généré à concentration élevée et le seuil de détection des hybrides (4,7 et 9 ng/mL). D'autre part cela permet de prendre en compte le coût de production d'un produit PCR marqué à la digoxigénine.

Pour les oligonucléotides dont le coût est négligeable nous avons décidé de nous placé en excès d'oligonucléotide (100 µM) bien au delà du seuil de détection des hybrides (0,1 à 1µM)

II.3 –Essai de spécificité des macroarrays :

Cet essai à pour but de vérifier que cette technique présente bien les qualités discriminantes appropriées pour le typage moléculaire de souches de Vibrios apparentées à *V. splendidus*. Pour évaluer la spécificité, nous avons utilisé d'une part les oligonucléotides designés à partir de l'alignement des séquences du gène *toxR* des différentes souches type

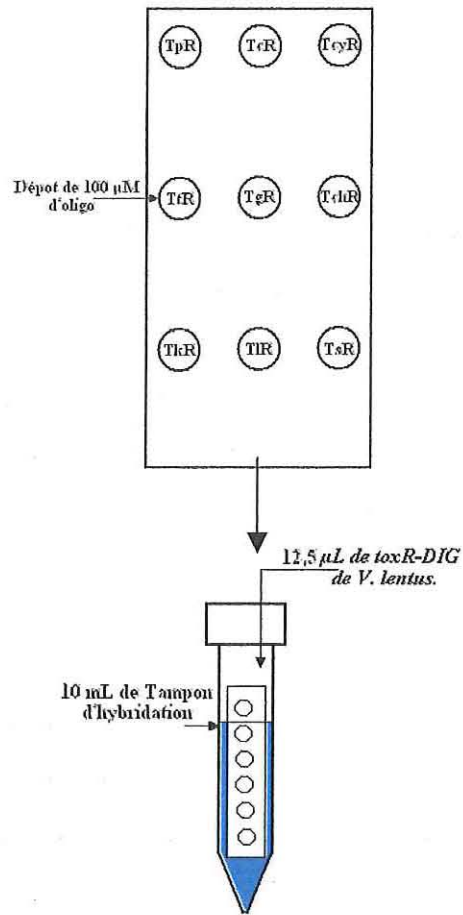
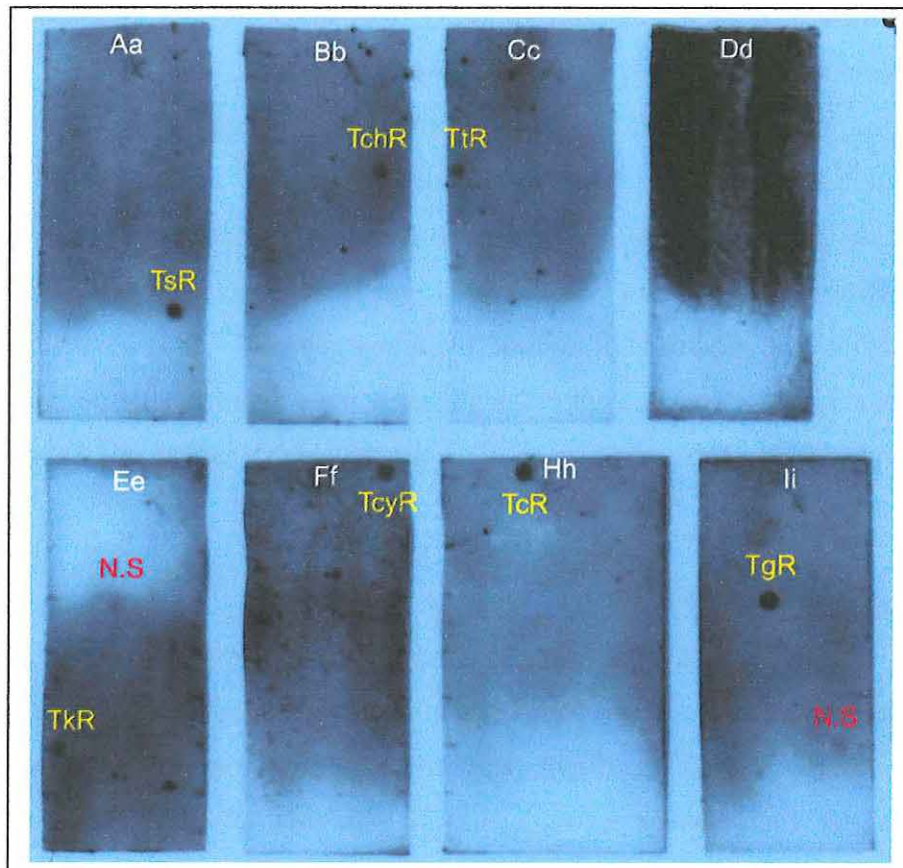


Schéma des membranes pour le test de spécificité.



Film photographique des membranes de spécificité.

de *Vibrio* apparentées à *V. splendidus* (voir matériels et méthodes), grâce à la mise en évidence d'une partie très variable de ce gène, d'une longueur de 20 nucléotides environ. Ce sont ces souches types qui ont été utilisées également pour générer un produit PCR *toxR-DIG*. Chaque combinaison possible du couple oligonucléotide/ produits PCR *toxR-DIG* a été testée afin d'évaluer la spécificité des macroarrays.

⇒ Conception des membranes. Voir schéma page ci-contre :

Huit membranes destinées chacune à être hybridées avec le produit PCR *toxR-DIG* d'une souche type donnée ont été réalisées sur un modèle identique. Chacune comprend en effet les dépôts de l'oligonucléotide *toxR* de chaque souche type. Voir schéma page ci-contre. Seule une souche type ne figure pas dans ce test (*V. lentus*) à cause d'une difficulté rencontrée lors de la synthèse du produit *toxR-DIG*.

⇒ Interprétations. Voir film photographique ci-contre :

Si l'on compare le positionnement sur chaque membrane du spot ayant donné le signal le plus intense, on constate que pour 7 des 8 membranes le spot révélé correspond bien à l'hybridation de l'échantillon *toxR-DIG* de la souche type considérée avec l'oligonucléotide correspondant. A titre d'exemple le spot révélé pour la membrane incubée avec le produit PCR de la souche Aa (*V. splendidus*) apparaît bien au niveau du dépôt de l'oligonucléotide correspondant à cette souche, nommé TsR (repéré en jaune sur le film). Il en est de même pour les essais réalisés avec *V. chagasii* (membrane Bb), *V. tasmaniensis* (Cc) *V. cyclitrophicus* (Ff) et *V. crassostreae* (Hh) où la spécificité du signal d'hybridation est de 100%. Pour la membrane Dd (*V. pomeroyi*) on ne peut pas conclure sur les résultats du test, car on observe un bruit de fond trop important sur la membrane qui couvre en partie le signal d'hybridation. Enfin, pour deux souches testées on peut remarquer l'apparition d'un deuxième spot moins intense en dehors de celui attendu qui témoigne de la présence d'hétéroduplex ADN/ADN dû à une hybridation non spécifique (N.S en rouge sur le film). C'est le cas de la souche Ee (*V. kanaloae*) avec un spot à la position TgR (oligo de *V. gigantis*). C'est le cas également de la souche Ii (*V. gigantis*) avec un spot à la position TsR (oligo de *V. splendidus*).

QUATRIÈME CHAPITRE

Discussion, conclusion générale et perspectives

Au total ce sont 140 souches d'origines diverses mais provenant majoritairement de la collection LGP 2002 qui ont été typées génotypiquement, afin de sélectionner les souches apparentées à *V. splendidus* les plus proches des espèces *V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis* et *V. lentus*. En effet, l'objectif final était de conduire une analyse phylogénétique sur le gène *gyrB* de ces souches, incluant celles déjà identifiées lors de précédentes études, mais également de vérifier les deux hypothèses selon lesquelles un nombre accru de souches induirait soit :

- une amélioration de la résolution de la typologie de l'arbre *gyrB* au niveau des espèces *V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis* et *V. lentus*. Celles ci restent en effet indiscernables par cette technique alors qu'elle a été démontrée congruente (Le Roux et al. 2004) avec la méthode de l'hybridation ADN/ADN considéré comme référence en taxonomie bactérienne.

- aucun changement majeur de typologie de l'arbre *gyrB*. En effet il est envisageable que ce groupe de souches soit constitué, plus par un continuum de souches pouvant résulter de transferts horizontaux de gènes et d'évènements de recombinaisons fréquents entre souches, que par des espèces bien délimitées répondant aux critères classiques de la taxonomie bactérienne.

Les 140 souches étudiées ont pu être classées en 24 génotypes différents par la technique de PCR-RFLP utilisant le gène *gyrB* et l'enzyme *HhaI*. Cinq génotypes différents ont été trouvés identiques à celui d'une souche type de *Vibrio* apparentée à *V. splendidus*. En effet le génotype de *V. kanaloae* a pu être retrouvé pour les génotypes LGP2/SBE3, de même pour *V. crassostreae/gigantis* avec LGP15/LPI3, *V. pomeroyi* avec SBE2, *V. tasmaniensis/lentus* avec SBE4 et enfin *V. splendidus/cyclitrophicus* avec SBE6.

Des représentants de chaque génotype identifié ont été séquencés au niveau de leur gène 16S pour la sélection des souches appartenant à *V. splendidus*, puis de leur gène *gyrB* pour la sélection des souches appartenant au groupe des espèces *V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis* et *V. lentus*. Or seules trois souches provenant du souchier espagnol (P52, P54 et 43N) ont été finalement identifiées comme appartenant à ce groupe. Cependant, celles-ci n'améliorent pas la résolution de l'arbre phylogénétique en ce qui concerne les trois espèces *V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis*. Par contre, elles permettent pour la première fois de mettre en évidence l'espèce *V. lentus* avec une valeur satisfaisante de « bootstrap »

du groupe (75%). Le pouvoir pathogène de ces trois souches a été évalué en infection expérimentale. Deux se révèlent pathogènes pour l'huître creuse *C. gigas*, il s'agit de P52 et P54, alors qu'elles ont été isolées d'un autre organisme aquatique (le poulpe, voir tableau souches sélectionnées, matériels et méthodes). La troisième 43N semble dénuée de pathogénicité.

Face à ce faible nombre de souches identifiées dans le groupe polyphylétique d'intérêt, il paraît difficile de pouvoir conclure quant aux deux hypothèses précédemment formulées. Cependant, toute cette étude phylogénétique montre à quel point il est nécessaire de développer des outils moléculaires d'identification taxonomique fiables et rapides à mettre en œuvre, que ce soit dans un objectif de recherche (dans le cadre par exemple d'un criblage de collection de souches) ou, dans un objectif de diagnostic vétérinaire. C'est dans ce contexte que nous avons travaillé sur la mise au point d'une technique de macroarrays. Les essais réalisés à partir des souches types d'espèces de *Vibrio* apparentées à *V. splendidus*, ont permis d'évaluer la sensibilité et la spécificité de cette technique. On peut donc dire à l'issue de ce travail qu'il s'agit d'une technique sensible, puisqu'un signal d'hybridation est détectable à partir de concentrations situées entre 4,7 et 9 ng/mL pour l'échantillon du gène étudié marqué, et entre 0,1 et 1 μ M d'ADN cible (oligonucléotides) spécifique de ce gène. Ceci en garantissant une bonne spécificité des signaux d'hybridation. En effet, nous avons pu déterminer lors d'un essai sur huit membranes correspondantes chacune à une des souches types, que 7 signaux d'hybridation spécifique étaient détectés. Une seule membrane n'avait pu être interprétée en raison de la présence d'un bruit de fond. Cependant, des signaux non spécifiques d'intensité plus faible que les précédents spécifiques, ont été également observés pour deux membranes de cet essai.

En ce qui concerne le résultat final de toute cette étude phylogénétique, il est surprenant que sur les trois souches identifiées comme appartenant au groupe polyphylétique d'intérêt, aucune ne provient de la collection LGP 2002. En effet, l'échantillonnage de ces souches a été réalisé dans des conditions rigoureusement identiques à celles effectuées par GAY en 2001 pour constituer la collection LGP 2001. Or la phylogénie sur le gène *gyrB* des 125 souches constituant la LGP 2001, avait révélée au moins 6 souches appartenant au groupe d'intérêt.

La caractérisation taxonomique des 2 collections a montré qu'elles présentaient des similitudes importantes, notamment du fait de la présence d'un grand nombre de souches identifiées comme appartenant au groupe des *Vibrio splendidus*. A titre d'exemple dans le

cas de la LGP 2002, 43 souches sur les 115 totales présentent un génotype identique à celui des souches type *V. crassostreae/gigantis*.

Donc l'absence de souches d'intérêts dans la collection 2002, illustre le fait que le contexte pathologique et, précisément bactériologique associé au syndrome de mortalité estivale varie d'une année sur l'autre, et également selon les sites d'élevage des huîtres.

Il se pose maintenant la question de la technique de typage moléculaire, la plus judicieuse à employer, et qui offre les résultats les plus pertinents pour étudier la taxonomie de souches bactériennes comme celle effectuée sur les différentes souches de *Vibrio* étudiées. Si on regarde les résultats apportés par la PCR-RFLP, seulement 5 génotypes sur les 24 différents, ont pu être identifiés vis à vis d'une souche type apparentées à *V. splendidus*. Parmi ces génotypes, 4 ont été confirmés par le séquençage 16S et se sont bien retrouvés dans le groupe des *V. splendidus*. Mais pour le génotype LGP2 constitué des souches 11, 13, 15, 31, 33 et 35, la PCR-RFLP les avaient typées comme correspondant à *V. kanaloae*. Cependant, le séquençage du 16S a permis de les positionner en dehors du groupe des proches *V. splendidus* et, les a fait se rapprocher plutôt d'autres espèces de *Vibrio* comme *V. aesturianus* ou *V. harveyi*. Démontrant donc la possibilité d'introduction d'erreurs de typage par cette technique.

Egalement, si on compare le résultats PCR-RFLP des 4 génotypes identifiés, avec le résultats de la phylogénie sur le gène *gyrB*, on constate là-aussi des divergences. En effet, la souche 50 appartenant au génotype LGP15 et la souche 01/100 au LPI3, ont toutes les deux été typées *V. crassostreae/gigantis* par PCR-RFLP. Mais sur l'arbre *gyrB* elle se sont positionnées dans le groupe de *V. cyclitrophicus* souche type. De même que la souche LMG 21575 du SBE4, correspondant au génotype des souches types *V. tasmaniensis/lentus*, a été placée dans le groupe de *V. splendidus* souche type. Enfin en dernier exemple, le génotype SBE6 identifié *V. splendidus/cyclitrophicus*, est constituée de la souche LMG 11753 qui s'est placée dans le groupe de *V. fortis* souche type, et de la P54 que l'on a retrouvée dans le groupe phylogénétique d'intérêt proche de la souche type de *V. lentus*.

De plus, on a constaté lors de cette étude qu'il existait également un manque de corrélation entre la PCR-RFLP et la technique FAFLP qui a été utilisée par le LMG Belge pour typer les souches qu'ils nous ont transmis par la suite (souches Souchier Belge). Or comme nous l'avons déjà vu, la technique FAFLP présente l'avantage d'offrir en typage moléculaire des résultats similaires à l'hybridation ADN/ADN (Thompson. 2003b), qui reste la technique de référence en systématique bactérienne pour l'identification d'une souche en terme

d'espèce (Stackenbrandt, 2002). L'ensemble de ces résultats attestent donc des potentialités limitées de la PCR-RFLP en terme de typage moléculaire de souches de *Vibrios* apparentées à *Vibrio splendidus*, c'est une technique qui apparaît somme toute peu fiable. Ceci peut néanmoins être expliqué car cette technique ne peut s'affranchir des potentialités de mutagenèse du gène étudié. Donc le changement d'une seule base peut entraîner l'apparition ou la disparition d'un site de restriction ce qui va considérablement affecter le typage des souches. D'autant que nous avons travaillé avec cette technique sur un seul gène, on peut donc se poser la question de savoir si il est vraiment judicieux de l'appliquer dans ces conditions. En effet, le nombre de sites de restriction peut être limité par gène et donc ne pas refléter le degré de polymorphisme qu'il existe entre deux souches bactériennes. En effet, en PCR-RFLP le polymorphisme est uniquement détecté au niveau des sites de coupure de l'enzyme de restriction. Par exemple, si la digestion avec une enzyme donnée génère 3 fragments, cela correspond donc à 2 sites de coupure. La spécificité est finalement liée à 2×4 sites soit 8 sites, sur lesquels le degré de polymorphisme va être évalué. Egalement, le polymorphisme sera lié au positionnement de ces sites sur le gène à typer. Par comparaison, le séquençage étudie le polymorphisme de séquence sur plus de 400 sites. Pour rendre cette technique plus congruente avec la phylogénie établie sur le gène *gyrB*, il serait judicieux de générer d'avantage de polymorphisme en utilisant soit plusieurs enzymes de restriction, soit en typant les souches sur plusieurs gènes.

Donc bien que la technique de la PCR-RFLP soit peu onéreuse et facile à mettre en oeuvre, il est évident que dans les conditions auxquelles nous l'avons utilisée, elle ne peut rivaliser en terme de spécificité avec le séquençage de gène d'intérêt.

D'autant que le séquençage de certains gènes offre plusieurs avantages, pour le criblage de collection de souches bactériennes. C'est le cas notamment du gène 16S. En effet, l'avantage d'utiliser ce gène, c'est qu'il présente un fort degré de conservation au sein des espèces. C'est donc un très bon marqueur d'espèce. Il est particulièrement requis pour identifier les souches apparentées au groupe de *V. splendidus*. D'un point de vue méthodologique, c'est un gène facilement amplifiable par PCR (en utilisant des amorces universelles), car il est présent en grand nombre de copies dans le génome. Enfin c'est un gène extrêmement étudié donc il existe beaucoup de séquences disponibles dans les bases de donnée (GenBank). Toutes les nouvelles espèces décrites ont donc leur séquence 16S répertoriée, ce qui permet d'étudier la phylogénie sur des séquences nucléotidiques particulièrement pertinentes.

L'avantage de travailler avec le gène *gyrB*, c'est qu'il facilite grandement les analyses phylogénétique car il est très polymorphe, il présente donc un intérêt particulier pour distinguer les espèces apparentées à *Vibrio splendidus* (*V. chagasii*, *V. cyclitrophicus*, *V. crassostreae* et *V. gigantis*). De plus, il est congruent dans ses résultats avec la technique des hybridations ADN/ADN (technique de référence en systématique chez les procaryotes). Cependant c'est une technique qui est relativement dispendieuse en réactifs, en temps de mise en œuvre, et analyse des séquences. Elle n'est donc pas la plus judicieuse pour un criblage rapide et peu onéreux d'une collection de souche.

C'est la raison pour laquelle nous avons souhaité évaluer la méthode de typage par macroarray en raison de sa commodité d'emploi. Elle nécessite en effet un investissement en matériel réduit par comparaison au séquençage, par exemple. En effet, un thermocycleur et un système de révélation des hybrides ADN/ADN sont suffisants. De plus c'est une méthode évolutive dans le sens où le nombre de sondes différentes ajoutées à la membrane peut être rajouté à l'infini et, le système miniaturisé sur un support de verre comme c'est le cas des micropuces à ADN, dans un but d'identification taxonomique bien sûr mais également de recherche de gènes de virulence par exemple. Lors de cette étude, nous avons travaillé uniquement avec le gène *toxR*, mais il est évident que plusieurs gènes d'intérêt taxonomique pourraient être étudiés simultanément en les amplifiant par PCR multiplex par exemple.

Toutefois, avant de pouvoir utiliser cette technique en tant qu'outil de typage de « routine », il convient de continuer à travailler sur la mise au point. En effet, la présence d'hybridation non spécifique sur deux des membranes du test de spécificité montre que l'on ne maîtrise pas encore parfaitement cette technologie, soit dans les étapes d'hybridation, soit dans les étapes de lavage et de révélation.

Nous avons cependant cherché à élucider la formation de ces hétéroduplexes non spécifiques. Pour ce faire, nous avons déterminé le pourcentage d'homologies de séquence qu'il pouvait y avoir entre les oligonucléotides impliqués dans ces hybridations non spécifiques et l'oligonucléotide spécifique des souches pour lesquelles cela s'est produit. Or on a constaté qu'il n'y avait finalement pas de fortes homologies pour les différents oligos concernés, respectivement 55% entre les oligos TkR et TgR, et 63% entre TgR et TsR. Par conséquent ces hétéroduplexes sont considérés comme instables, et en jouant sur les conditions de stringence du milieu d'hybridation, ou des lavages (pH, T°C, salinité), il est fort probable que l'on puisse s'affranchir de ces spots non spécifiques.

Egalement, tout un travail doit être envisagé pour permettre l'élimination du bruit de fond, dont nous avons pu constater la présence régulière sur les membranes, qui rend la lecture difficile voir parfois impossible, car il tend à inhiber le signal de détection des hybridations. Au cours de la mise au point, nous avons déjà effectué de nombreux essais afin de déterminer les causes de ce bruit de fond. Or nous avons constaté, que l'utilisation de certains tampons constitués de Chlorure de magnésium ($MgCl_2$) lors des lavages, favorisaient l'apparition de celui-ci.

En fait il semblerait que les ions Mg^{2+} soient utilisés en tant que cofacteurs par la phosphatase alcaline (PA : enzyme du système immuno-enzymatique de détection) dans la réaction d'émission du signal d'hybridation. Par conséquent, si l'anticorps anti-DIG qui est fixé à la PA s'est déposé à un endroit non spécifique sur la membrane, alors en présence de ces ions Mg^{2+} , on aura l'apparition d'un signal sur le film auto radiographique, sous la forme de grains noirs, voire d'une tache sombre recouvrant une partie de la membrane. Une des solutions consiste donc à utiliser des tampons dénués de ce $MgCl_2$. C'est ce que nous avons fait, mais on constate que le bruit de fond persiste encore sur certaines membrane. On peut donc penser que la nature du support influence l'apparition de ce bruit de fond. Il est donc envisageable pour les travaux de mises au point à venir, une application de cette technologie sur des supports autres que le nylon. Par exemple un support de verre permettrait peut-être d'éviter l'accrochage intempestif de composés ou résidus qui sont impliqués dans l'apparition du bruit de fond.

Néanmoins, bien qu'il réside dans cette technique des inconvénients, mais qui semblent pouvoir être maîtrisés par des mises au point supplémentaires, de part sa sensibilité, sa spécificité et sa rapidité (résultats disponibles en quelques heures), on peut quand même affirmer que la technologies des macroarrays remplit bien sa fonction d'outil moléculaire de choix, pour le criblage rapide de collections de souches d'intérêts.

Dans le même état d'esprit de vouloir simplifier les techniques de typage moléculaire, nous avons évalué une technique d'extraction d'ADN bactérien très rapide et peu onéreuse avec le réactif *Viagen*, ne prenant que quelques dizaines de minutes et qui nous a fourni des résultats satisfaisants. Il est à noter cependant, qu'il n'est pas possible de conserver longtemps l'ADN dans ce tampon d'extraction à 4°C, deux semaines tout au plus. Néanmoins, ce réactif répond bien à l'objectif que l'on s'est fixé, de mettre au point des outils moléculaire particulièrement pertinents et adaptés pour offrir un diagnostic rapide dans le cadre d'un typage moléculaire de collections de souches bactériennes.

- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -

ALSINA M & BLANCH A. R. (1994). A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology* 76:79-85.

ANGULO L, LOPEZ J.E, LEMA C & VICENTE J.A. (1992). *Vibrio pelagius* associated with mortalities in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*. *Thalassas* 10:129-133.

BARNABÉ G. (1985). Aquaculture Volume 1. Partie 2 – La culture des mollusques. Chap 1 Reproduction contrôlée des mollusques bivalves. Lavoisier Tec & Doc (Eds), 521 p, pp 273-284.

BAUMANN P, BAUMANN L, BANG S, WOLLKALIS M. J. (1980). Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckea* and *Photobacterium*: abolition of the genus *Beneckea*. *Current Microbiology* 4:127-132.

BAUMANN P & SCHUBERT R. H. W. (1984). *Vibrionaceae* Véron 1965. In: Bergey's manual of systematic bacteriology Holt.-Baltimore J. G. (ed), Vol 1. Williams & Wilkins, London, p 516-538.

BEATTIE J. H, CHEW K. K & HERSHBERGER W. K. (1980). Differential survival of selected strains of pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during summer mortality. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* 70:184-189.

CHENEY D. P, MACDONALD B. F & ELSTON R. A. (2000). Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *Journal of Shellfish Research* 19:353-359.
conservation and evolutionary relationship. *J Bacteriol* 174:3843-3849.

EGAN E.S & WALDOR M.K. (2003). Distinct replication requirements for the two *Vibrio cholerae* chromosomes. *Cell*. 114(4):521-30.

ELSTON R. A, BEATTIE J. H, FRIEDMAN C, HEDRICK R & KENT M. L. (1987). Pathology and significance of fatal inflammatory bacteraemia in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Journal of Fish Diseases* 10:121-132.

FARTO R, MONTES M, PEREZ MJ, NIETO TP, LARSEN JL & PEDERSEN K. (1999). Characterization by numerical taxonomy and ribotyping of *Vibrio splendidus* biovar I and *Vibrio scophthalmi* strains associated with turbot cultures. *J Appl Microbiol* 86:796-804.

FARTO R, ARMADA S.P, MONTES M, GUISANDE J.A, PEREZ M.J & NIETO T.P. (2002). *Vibrio lentus* associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*). *J. Invertebrate Pathology* 83:149-156.

FAURY N, SAULNIER D, THOMPSON F. L, GAY M, SWINGS J & LE ROUX F. (2004) *Vibrio crassostreae* sp. nov., isolated from the hemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:2137-2140.

FRIEDMAN C. S & HEDRICK R. P. (1991). Pacific oyster nocardiosis: Isolation of the bacterium and induction of laboratory infections. *Journal of Invertebrate Pathology* 57:109-120.

FRIEDMAN C. S, BEAMAN B. L, CHUN J, GOODFELLOW M, GEE A & HEDRICK R. P. (1998). *Nocardia crassostreae* sp. nov., the causal agent of nocardiosis in Pacific oysters. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48 Pt 1:237-246.

GALTIER N, GOUY M & GAUTIER C. (1996). SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* 12:543-548.

GARRITY G.M, WINTERS M, KUO A.W & SEARLES D.B. (2002). Taxonomic Outline of the Prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition., Release 2.0., Springer-Verlag, New York. 350 pages. DOI: 10.1007/bergeysoutline. <http://141.150.157.80/bergeysoutline/main.htm>.

- GASCUEL O.** (1997). BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol Biol Evol* 14:685-695.
- GATESOUBE FJ, LAMBERT C & NICOLAS JL.** (1999). Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *J Appl Microbiol* 87:757-763.
- GAY M.** (2004). Infection expérimentale chez *Crassostrea gigas* : étude de deux souches pathogènes apparentées à *Vibrio splendidus*, Thèse de doctorat, université de La Rochelle, La Rochelle, France, 214 p.
- GLUDE J. B.** (1975). A summary report of pacific coast oyster mortality investigations 1965-1972 Third U.S.-Japan Meeting on Aquaculture, Tokyo, Japan, p 1-28.
- GOMEZ-LEON J, VILLAMIL L, LEMOS L, NOVOA B & FIGUERAS A.** (2005). Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured Carpet Shell Clam (*Ruditapes decussatus*) Larvae Associated with Mass Mortalities. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:98-104.
- GOULLETQUER P, SOLETCHNIK P, LE MOINE O, RAZET D, GEAIRON P, FAURY N & TAILLADE S.** (1998). Summer mortality of the Pacific cupped oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oléron (France). *Conseil International pour l'Exploration de la Mer CM 1998 / CC 14:20 p*
- GRELON M.** (1978). Saintonge pays des huîtres vertes. Rupella Eds, La Rochelle, France, 361 p.
- HEDLUND B.P & STALEY J.T.** (2001). *Vibrio cyclotrophicus* sp. Nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:61-66.
- IMAI T, NUMACHI K.I, OIZUMI J & SATO S.** (1965). Studies on the mass mortality of the oyster in Matsushima Bay II. Search for the cause of mass mortality and the possibility to prevent it by transplantation experiment. *Bulletin of the Tohoku National Fisheries Research Institute* 25:27-38.
- KWOK AY, WILSON JT, COULTHART M, NG LK, MUTHARIA L & CHOW AW.** (2002). Phylogenetic study and identification of human pathogenic *Vibrio* species based on partial *hsp60* gene sequences. *Can J Microbiol* 48:903-910.
- LACOSTE A, JALABERT F, MALHAM S, CUEFF A, GELEBART F, CORDEVANT C, LANGE M & POULET S. A.** (2001). A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Diseases of Aquatic Organisms* 46:139-145.
- LE ROUX F, GAY M, LAMBERT C, WAECHTER M, POUBALANNE S, CHOLLET, NICOLAS J. L & BERTHE F.** (2002). Comparative analysis of *Vibrio splendidus* related STRAINS isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic Living Resources* 15:251-258.
- LE ROUX F, GAY M, LAMBERT C, NICOLAS J. L, GOUY M, BERTHE F.** (2004) Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences. *Diseases of Aquatic Organisms* 58:143-150.
- LE ROUX F, GOUBET A, THOMPSON F. L, FAURY N, GAY M, SWINGS J & SAULNIER D.** (2005). *Vibrio gigantis* sp. nov., isolated from the hemolymph of reared oysters (*Crassostrea gigas*). IJSEM. Sous presse.
- LONETTO N, GRIBSKOV N & GROSS C. A.** (1992). The sigma 70 family: sequence
- MACIAN MC, LUDWIG W, AZNAR R, GRIMONT PA, SCHLEIFER KH, GARAY E & PUJALTE MJ.** (2001) *Vibrio lentus* sp. nov., isolated from Mediterranean oysters. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1449-1456.
- MARTIN Y, BONNEFONT J.L. & CHANCERELLE L.** (2002) Gorgonians mass mortality during the 1999 late summer in French Mediterranean coastal waters: the bacterial hypothesis. *Water Research* 36:779-782.

- MAURER D & COMPS M.** (1986). Mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* dans le Bassin d'Arcachon : facteurs du milieu, aspects biochimiques et histologiques. *Colloque International de Pathologie en Aquaculture Marine, Montpellier*:29-42.
- MEYERS T. R, SHORT S & EATON W.** (1990). Summer mortalities and incidental parasitisms of cultured Pacific oysters in Alaska. *Journal of Aquatic Animal Health* 2:172-176.
- NICOLAS JL, CORRE S, GAUTHIER G, ROBERT R & ANSQUER D.** (1996). Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis Aquat Org* 27:67-76.
- OSORIO C.R & KLOSE K.E.** (2000). A region of the transmembrane regulatory protein ToxR that tethers the transcriptional activation domain to the cytoplasmic membrane displays wide divergence among *Vibrio* species. *J Bacteriol* 182:526-528.
- PACINI F.** (1854). Osservazione microscopiche e deduzioni patologiche sul *Cholera Asiatico*. *Gazzetta Medica Italiana Toscana Firenze* 6:405-412.
- RENAULT T, COCHENNEC N, LE DEUFF R. M & CHOLLET B.** (1994). Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 14:64-66.
- RENAULT T, LE DEUFF R. M, COCHENNEC N, CHOLLET B & MAFFART P.** (1995). Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: a comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Veterinary Research* 26:539-543.
- ROBERT R & GERARD A.** (1999). Bivalve hatchery technology: the current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquatic Living Resources* 12:121-130.
- SOLETCHNIK P, RAZET D, GEAIRON P, FAURY N & GOULLETQUER P.** (1997) Ecophysiology of maturation and spawning in oyster (*Crassostrea gigas*): metabolic (respiration) and feeding (clearance and absorption rates) responses at different maturation stages. *Aquatic Living Resources* 10:177-185.
- SOLETCHNIK P, LE MOINE O, FAURY N, RAZET D, GEAIRON P & GOULLETQUER P.** (1999). Summer mortality of the oyster in the Bay Marennes-Oleron: spatial variability of environment and biology using a geographical information system (GIS). *Aquatic Living Resources* 12:131-143.
- STACKEBRANDT E & GOEBEL B.M.** (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:846-849.
- STACKEBRANDT E, FREDERIKSEN W, GARRITY GM, GRIMONT PAD & 9 OTHERS.** (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1043-1047.
- SUGUMAR G, NAKAI T, HIRATA Y, MATSUBARA D & MUROGA K.** (1998). *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis Aquat. Org.*, 19:111-118.
- THOMPSON F.L, HOSTE B, VANDEMEULEBROECKE K & SWINGS J.** (2001). Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism. *Syst. Appl. Microbiol.* 24 :520-539.
- THOMPSON F.L, HOSTE B, THOMPSON C.C, GORIS J, GOMEZ-GILL B, HUYS L, DE VOS P & SWINGS J.** (2002). *Entervibrio norvegicus* gen. nov., sp. nov., isolated from the gut of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae : a new member of the family Vibrionaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 2015-2022.
- THOMPSON F.L, THOMPSON C.C, LI Y, GOMEZ-GILL B, VANDENBERGHE J, HOSTE B & SWINGS J.** (2003a). Description of *Vibrio kanaloae* sp. nov, *Vibrio pomeroyi* sp. nov and *Vibrio chagasii* sp. nov, from sea water and marine animals. *Int J Syst Evol Microbiol* online <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.024900>.

THOMPSON F. L. (2003b) Improved taxonomy of the family *Vibrionaceae*. Thèse de Doctorat, Université de Gent, Gent, Belgique, 270 p.

THOMSON R, MACPHERSON H.L, RIAZA A & T.H. BIRKBECK. (2005). *Vibrio splendidus* biotype 1 as a cause of mortalities in hatchery-reared larval turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Applied Microbiology* 99:243-250.

VANDAMME P, POT B, GILLIS M, DE VOS P, KERSTERS K & SWINGS J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 60:407-238.

WAECHTER M, LE ROUX F, NICOLAS JL, MARISSAL E & BERTHE F. (2002). Characterisation of *Crassostrea gigas* spat pathogenic bacteria. *CR Biologies* 325:231-238.

WATT P. N. & HICKSON I. D. (1994). Structure and function of type II DNA topoisomerases. *Biochem J* 303:681-695.

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 & TRÜPER H.G. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol* 37:463-464.

YAMAMOTO S & HARAYAMA S. (1995). PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl Environ Microbiol* 61:1104-1109.

YAMAMOTO S & HARAYAMA S. (1998). Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16SrRNA genes. *Int J Syst Bacteriol* 48:813-819.

Annexe 1

Souches LGP collection 2002

1 tube par souche

Appellation souche	Origine	n° REPAMO
1	Bouin Famille F	02/15
2	Bouin Famille F	02/15
3	Bouin Famille F	02/15
4	Bouin Famille F	02/15
5	Bouin Famille F	02/15
6	Bouin Famille F	02/15
7	Bouin Famille F	02/15
8	Bouin Famille F	02/15
9	Bouin Famille F	02/15
10	Bouin Famille F	02/15
11	Bouin Famille F	02/15
12	Bouin Famille F	02/15
13	Bouin Famille F	02/15
14	Bouin Famille F	02/15
15	Bouin Famille F	02/15
16	Bouin Famille F	02/15
17	Bouin Famille B	02/22
18	Bouin Famille B	02/22
19	Bouin Famille B	02/22
20	Bouin Famille B	02/22
21	Bouin Famille B	02/22
22	Bouin Famille B	02/22
23	Bouin Famille B	02/22
24	Bouin Famille B	02/22
25	Bouin Famille B	02/22
26	Bouin Famille B	02/22
27	Bouin Famille B	02/22
28	Bouin Famille B	02/22
29	Bouin Famille B	02/22
30	Bouin Famille B	02/22
31	Bouin Famille B	02/22
32	Bouin Famille B	02/22
33	Bouin Famille B	02/22
34	Bouin Famille B	02/22
35	Bouin Famille B	02/22
36	Bouin Famille B	02/22
37	Bouin Famille B	02/22
38	Bouin Famille B	02/22
39	Bouin Famille B	02/22
40	Bouin Famille B	02/22
41	Témoin négatif 26/06	
42	Témoin négatif 26/06	
43	Témoin négatif 26/06	
44	Témoin négatif 26/06	
45	Témoin négatif 26/06	
46	Témoin négatif 26/06	
47	Témoin négatif 26/06	

48	Témoign négatif 26/06	
49	Témoign négatif 26/06	
50	Témoign négatif 26/06	
51	Témoign négatif 26/06	
52	Témoign négatif 26/06	
53	Témoign négatif 26/06	
54	Témoign négatif 26/06	
55	Témoign négatif 26/06	
56	Témoign négatif 26/06	
57	Témoign négatif 26/06	
58	Témoign négatif 26/06	
59	Témoign négatif 26/06	
60	Témoign négatif 26/06	
61	Témoign négatif 02/07	
62	Témoign négatif 02/07	
63	Témoign négatif 02/07	
64	Témoign négatif 02/07	
65	Témoign négatif 02/07	
66	Témoign négatif 02/07	
67	Témoign négatif 02/07	
68	Témoign négatif 02/07	
69	Témoign négatif 02/07	
70	Témoign négatif 02/07	
71	Témoign négatif 02/07	
72	Témoign négatif 02/07	
73	Témoign négatif 02/07	
74	Témoign négatif 02/07	
75	Témoign négatif 02/07	
76	Seudre 10/07	02/35
77	Seudre 10/07	02/35
78	Seudre 10/07	02/35
79	Seudre 10/07	02/35
80	Seudre 10/07	02/35
81	Seudre 10/07	02/35
82	Seudre 10/07	02/35
83	Seudre 10/07	02/35
84	Seudre 10/07	02/35
85	Seudre 10/07	02/35
86	Seudre 10/07	02/35
87	Seudre 10/07	02/35
88	Seudre 10/07	02/35
89	Baie des Veys 20/08/02	02/105
90	Baie des Veys 20/08/02	02/105
91	Baie des Veys 20/08/02	02/105
92	Baie des Veys 20/08/02	02/105
93	Baie des Veys 20/08/02	02/105
94	Baie des Veys 20/08/02	02/105
95	Baie des Veys 20/08/02	02/105
96	Baie des Veys 20/08/02	02/105
97	Baie des Veys 20/08/02	02/105
98	Baie des Veys 20/08/02	02/105
99	Baie des Veys 20/08/02	02/105
100	Baie des Veys 20/08/02	02/105
101	Baie des Veys 20/08/02	02/105
102	Baie des Veys 20/08/02	02/105
103	Baie des Veys 20/08/02	02/105

104	Baie des Veys 20/08/02	02/105
105	Témoignage négatif 20/08	
106	Témoignage négatif 20/08	
107	Témoignage négatif 20/08	
108	Témoignage négatif 20/08	
109	Témoignage négatif 20/08	
110	Témoignage négatif 20/08	
111	Témoignage négatif 20/08	
112	Témoignage négatif 20/08	
113	Témoignage négatif 20/08	
114	Témoignage négatif 20/08	
115	Témoignage négatif 20/08	

Annexe 2

Milieux de culture :

• Zobell :

- Pastone (BioRad) 4 g
- Extrait de Levure (BioRad) 1 g
- (Agar (BioRad) pour le milieu solide 15 g)
- EDMA qsp 1 L eau de Lewis (eau de mer artificielle).
- pH ajusté à 7,4
- Autoclave (20 min 121 °C)

• TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Saccharose) :

- Milieu TCBS sec (BioRad) 88 g
- Eau distillée 1 L
- Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète du milieu sec

• Eau de mer artificielle (eau de Lewis) 10X :

- NaCl (Sigma) 234 g
- KCl (Sigma) 15 g
- MgSO₄ 7H₂O (Sigma) 12 g
- CaCl₂ 2H₂O (Sigma) 1,5 g
- CaCl₂ anhydre (Sigma) 1,5 g
- eau distillée qsp 1 L
- Autoclave (20 min 121 °C)
- Conserver à 4 °C
- Diluer au 1/10^e pour utilisation pour les milieux de culture et les suspensions bactériennes (EDMA)