

69105
EGLO.BEG.O.

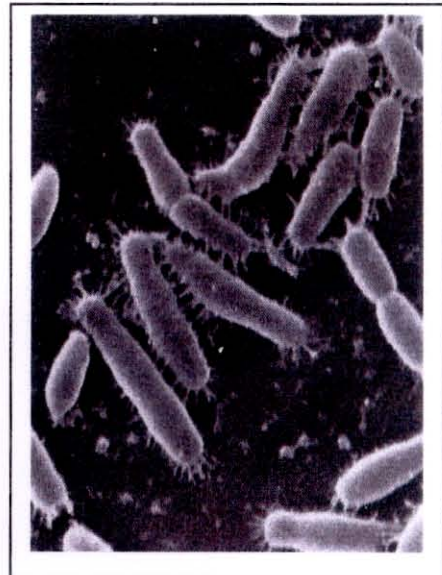
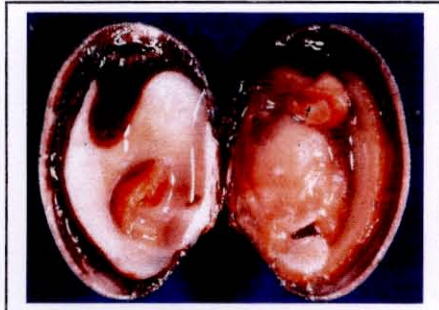
BEGUIER Jérémy

Stage effectué du 11 avril au 18 juin 2005

ifremer

**Diplôme Universitaire et Technologique
De Génie Biologique
Option : Industrie Agroalimentaire et Biologique**

Optimisation du diagnostic et épidémiologie de la maladie de l'anneau brun sur la côte atlantique



Laboratoire de Génétique et Pathologie de la station IFREMER de La Tremblade (17)



Institut Universitaire de Technologie de La Rochelle
Département Génie Biologique
Option Industrie Agroalimentaire et Biologique

IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 02685

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	5
I) PRESENTATION DE LA STRUCTURE D'ACCUEIL	6
1) Historique de l'IFREMER	6
2) La station de La Tremblade	6
3) Objectifs du laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP)	7
II) ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE – CONTEXTE	8
1) Les palourdes	8
1-1 Systématique et anatomie	8
1-2 Production - distribution	9
1-3 Les maladies	9
2) La maladie de l'anneau brun et <i>Vibrio tapetis</i>	10
2-1 Historique et étiologie	10
2-2 Distribution géographique et espèces affectées	10
2-3 Etude clinique	11
2-4 Facteurs environnementaux influençant la maladie	12
2-5 L'agent <i>Vibrio tapetis</i>	12
2-6 Diagnostic	13
2-7 Moyens de lutte – contrôle des maladies	15
3) Contexte du stage	16
III) MATERIEL ET METHODE	18
1) Echantillonnage	18
2) Prélèvement du fluide extrapalléal	19
3) Extraction d'ADN	19
3-1 Méthode Chelex	19
3-2 Méthode phénol chloroforme	20
3-3 Méthode d'extraction avec des kits Quiagen®	21
4) L'amplification par polymérisation en chaîne (PCR)	22
4-1 Définition	22
4-2 Principe général de la PCR	22
4-3 PCR universelle 16S	23
4-4 PCR spécifique <i>Vibrio tapetis</i>	24
5) Gel – révélation	25

IV) RESULTATS ET DISCUSSION	26
1) PCR universelle	26
1-1 Résultats et problèmes rencontrés	26
1-2 Optimisation de l'extraction	27
2) PCR spécifique <i>Vibrio tapetis</i>	28
2-1 Résultats	28
2-2 Comparaison avec les observations macroscopique	28
2-3 Comparaison à des données antérieures	29
CONCLUSION – PERSPECTIVES	31
ANNEXE I : Localisation des points de prélèvements	32
ANNEXE II : Tableau des résultats de la PCR universelle	34
ANNEXE III : Tableau des résultats de la PCR <i>Vibrio tapetis</i>	35
ANNEXE IV : Analyses coquillères et PCR des lots analysés	36

INTRODUCTION

En 1998, la production de mollusques d'aquaculture dans le monde, a atteint 9.1 millions de tonnes, ce qui représente 23% de la production mondiale d'aquaculture tous secteurs confondus, et un marché d'environ 8.5 milliards de dollars. Cette industrie concerne de nombreux pays et en particulier l'hémisphère Nord avec les Etats-Unis, le Canada, le Japon, la Corée, la France, l'Espagne et les Pays-Bas. Les principales espèces cultivées sont les huîtres (36% de la production totale de mollusques), les palourdes (23%), les coquilles St Jacques (15%) et les moules (13%).

La culture des mollusques est soumise à de nombreux facteurs pouvant être la cause de mortalités. Beaucoup de facteurs abiotiques, tels que les conditions environnementales (la salinité, la température, l'oxygène, le climat, les tempêtes...), les polluants, les mauvaises pratiques d'élevage, et de facteurs biotiques comme les prédateurs et les compétiteurs, n'ont qu'un impact limité et n'ont jamais menacé une économie bien établie de conchyliculture (Grizel et al., 1996).

L'impact des maladies infectieuses et parasitaires chez les mollusques marins est bien plus important. En relation avec l'augmentation des capacités d'élevage, de son intensification et des transferts d'animaux, les épizooties se sont multipliées et propagées très rapidement.

A l'échelle nationale, la conchyliculture a connu des épizooties catastrophiques ; l'huître portugaise (*Crassostrea angulata*) a disparu des côtes françaises, suite à des infections impliquant des iridovirus. L'huître plate (*Ostrea edulis*) a vu sa production fortement réduite suite à l'introduction de deux maladies parasitaires, la bonamiose et la marteiliose.

La maladie de l'anneau brun, maladie d'origine bactérienne due à *Vibrio tapetis* a engendré depuis 1987 en Europe des mortalités allant de 60 à 80% dans les élevages, éclosiers et bancs naturels de palourdes japonaises *Ruditapes philippinarum* et de palourdes européennes *R. decussatus* (Paillard et al., 1989 ; Borrego et al., 1996), compromettant le développement de cette filière aquacole.

Mon sujet de stage a pour but d'obtenir une image de la maladie de l'anneau brun chez les palourdes dans les principaux bassins de la côte atlantique, en période automnale par recherche de *Vibrio tapetis*, par PCR (amplification par polymérisation en chaîne).

Les étapes suivies seront les suivantes :

- Extraction d'ADN à partir d'échantillons de liquide extrapalléal de palourdes.
- Vérification de l'état de l'ADN extrait par PCR en utilisant des amorces universelles.
- Détermination du statut de chaque échantillon vis-à-vis de la bactérie par PCR en utilisant des amorces spécifiques de *Vibrio tapetis*.

I) PRESENTATION DE LA STRUCTURE D'ACCUEIL

1) Historique de l'IFREMER

L'IFREMER, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, est un établissement public à caractère industriel et commercial (EPIC) créé par le décret du 5 juin 1984.

Il résulte de la fusion du Centre National d'Exploitation pour les Océans (CNEXO) et de l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes (ISTPM). Il est placé sous la tutelle des ministères chargés de la recherche, de la pêche et cultures marines, de l'équipement, du logement et des transports.

La présence de l'IFREMER sur l'ensemble du littoral constitue une des originalités et une des forces de l'institut. Elle permet à la fois d'assurer l'observation et la surveillance de l'environnement côtier et de rester proche du monde maritime et des professionnels de la mer. L'IFREMER est présent dans 78 laboratoires ou services de recherche répartis sur 24 sites sur le littoral métropolitain ou dans les DOM-TOM (voir figure 1).

L'IFREMER a pour mission d'évaluer, de prévoir l'évolution des ressources des océans, de protéger le littoral marin et côtier, de favoriser le développement socio-économique du monde maritime.

Quelques chiffres :

- un budget annuel de près de 150 millions d'euros
- 1 380 salariés Ifremer et 320 salariés de l'armateur Genavir
- 5 centres (Boulogne-sur-Mer, Brest, Nantes, Toulon, Tahiti) et 21 stations sur le littoral métropolitain et dans les DOM TOM
- 25 sites de recherche
- un ensemble de moyens d'élevage aquacole et d'expérimentation
- 7 navires (dont 4 hauturiers), 1 sous-marin habité, 1 engin télé opéré pour grande profondeur (- 6000 m)
- un ensemble de moyens d'essais

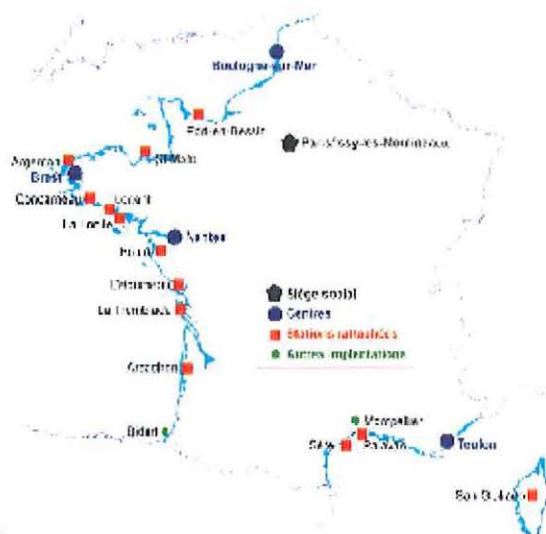


Figure 1: Répartition de l'IFREMER en France métropolitaine

2) La station de La Tremblade

La station de La Tremblade est spécialisée dans les domaines de la conchyliculture et de la surveillance de l'environnement littoral.

Elle regroupe 2 laboratoires :

- Le LER/PC (Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais) dont les missions principales consistent à mettre en œuvre des réseaux de surveillance garantissant

aux conchyliculteurs et aux consommateurs une qualité des eaux et des coquillages du littoral charentais.

Il étudie également la croissance des coquillages afin d'améliorer les productions du bassin.

- Le LGP (Laboratoire de Génétique et Pathologie), spécialisé dans les domaines de la génétique et de la pathologie des invertébrés marins et plus spécifiquement des mollusques bivalves.

3) Objectifs du laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP)

Les principaux objectifs du laboratoire visent essentiellement à développer la recherche chez les mollusques bivalves marins dans les domaines de :

La pathologie : surveillance des ressources conchylicoles, identification des agents pathogènes, description de leur cycle de développement, mise au point des techniques de reproduction expérimentale des maladies, développement d'outils performants de diagnostic utilisables à des fins de recherche ou de surveillance, étude de l'impact de ces maladies et de leur évolution géographique et temporelle.

La génétique : étude des ressources génétiques, testage de nouvelles espèces, de nouvelles populations et d'hybrides pour limiter les risques liés à la monoculture. Obtention de souches résistantes ou tolérantes aux maladies pour essayer d'apporter des réponses aux épizooties qui remettent en cause les productions. Création de souches ou de lignées présentant de meilleures performances de croissance, de qualité de chair, une meilleure adaptation aux conditions de milieu d'élevage ou éventuellement de faibles besoins métaboliques, pour améliorer la productivité des entreprises.

En tant que laboratoire thématique, le LGP anime les programmes de recherche en matière de génétique et de pathologie.

En pathologie, le LGP est Laboratoire National de Référence (LNR) et Laboratoire Communautaire de Référence (LCR) en pathologie des mollusques. Il est laboratoire de référence pour l'Office International des Epizooties (OIE), vis à vis de deux maladies de mollusques (la Bonamiose et la Marteiliose). Il anime également le réseau de surveillance en pathologie des mollusques (REPAMO). Ce positionnement au niveau national et international implique que certaines actions de recherche débordent du cadre strict des mollusques.

II) ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE - CONTEXTE

1) Les palourdes

1-1 Systématique et anatomie

La palourde est un mollusque bivalve, dont la position systématique est précisée dans le tableau 1. Les espèces élevées sur les côtes françaises sont *Ruditapes decussatus* (palourde européenne) et *Ruditapes philippinarum* (palourde japonaise).

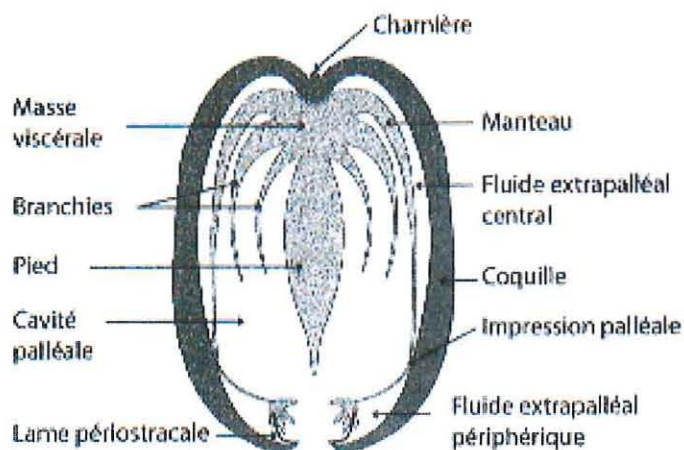
Embranchement	Mollusques
Classe	Bivalves ou Lamellibranches
Sous classe	Eulamellibranches
Ordre	Vénéroïdés
Famille	Vénéridés
Genre	Ruditapes
Espèce	<i>Ruditapes philippinarum</i> et <i>Ruditapes decussatus</i>

Tableau1 : Position systématique de *Ruditapes philippinarum* et *Ruditapes decussatus*

La palourde est constituée d'une coquille composée de deux valves articulées, et d'un corps mou. Celui-ci est constitué du manteau, d'une paire de branchies, de la masse viscérale et d'un pied musculueux (voir figure 2). Le manteau forme deux battants accolés aux faces internes de la coquille et délimite ainsi la cavité palléale de l'animal.

L'espace entre le manteau et la coquille correspond au compartiment extrapalléal. La forme générale de la coquille peut varier énormément d'une population à l'autre. Par exemple pour une espèce donnée, les palourdes de la Baie de Morlaix sont trapues et courtes alors que celles de l'étang de Thau sont longues et fines. La coloration externe de la coquille est très variable. Les populations septentrionales sont généralement moins colorées que les populations méridionales. La coloration interne de la coquille passe du blanc crémeux au jaune pâle, avec parfois du violet.

La principale différence entre les deux espèces se trouve au niveau des siphons, ceux-ci sont séparés pour l'espèce *Ruditapes decussatus* et collés pour *Ruditapes philippinarum*.



**Figure 2 : Représentation schématique d'une coupe transversale de palourde
(Dessin : thèse Gwénaëlle Choquet)**

1-2 Production-distribution

La vénériculture (élevage des palourdes) a manifesté un essor prometteur au cours des années 1980, grâce à la mise au point de techniques d'écloserie et de grossissement, adaptées à la palourde japonaise (*Ruditapes philippinarum*), importée en France entre 1972 et 1975. Cependant, elle n'est plus aujourd'hui en France qu'une activité marginale, suite à la maladie de l'anneau brun, maladie coquillière apparue en 1987 sur les parcs vénéricoles de Bretagne et qui s'est propagée par la suite sur toute la façade atlantique européenne.

La production française était en 2001 de 3442 tonnes et est essentiellement assurée par une activité de pêche ; seuls quelques parcs d'élevage ont pu subsister dans le golfe du Morbihan et sur les îles Chausey. Cependant, la production de palourdes représente dans le monde 23% de la production totale de mollusques juste derrière les huîtres (36%).

La palourde européenne s'étend de la Norvège au Sénégal (peu présente en Mer du Nord) et des Açores à la Mer rouge, alors que la palourde japonaise est répartie entre le Pakistan, Java et les Kouriles et a été introduite dans plusieurs pays tels que la France, la Grande Bretagne, l'Italie, l'Espagne, la Norvège, l'Irlande, les îles Hawaïennes et le long de la côte pacifique de l'Amérique du nord.

1-3 Les Maladies

On trouve divers parasites et bactéries pouvant infecter les palourdes tels que :

- Des Trématodes : les palourdes sont des hôtes intermédiaires des trématodes et peuvent héberger différents stades (sporocystes, cercaires, métacercaires). Les trématodes les plus souvent rencontrés chez les palourdes sont ceux du genre *Labratrema* et *Meiogymnophalus*. *Labratrema* est présent dans les gonades et tissus conjonctifs sous la forme de sporocystes, forme très virulente. Cependant, sa prévalence (nombre de palourdes infestées dans la population) est généralement modérée. *Meiogymnophalus* se trouve généralement sous la zone de l'umbo (près de la glande digestive et du tissu gonadique) et est présent sous la forme de métacercaire, forme peu virulente. Son infestation est modérée mais il peut avoir une prévalence élevée.
- Des Coccidies, protozoaires se trouvant dans l'épithélium des tubes rénaux et dont l'effet pathogène n'est pas connu.
- *Rickettsia* et *Chlamydia*, bactéries intracellulaires. Elles se localisent dans le cytoplasme des cellules épithéliales de branchies ou de la glande digestive. Leur impact est mal connu.
- *Mytilicola*, copépode qui se trouve dans la lumière du tube digestif. Il peut provoquer des lésions des tissus localement.
- *Perkinsus olseni*, protozoaire localisé au niveau des branchies et du tissu conjonctif. Il entraîne une diminution de la capacité respiratoire des palourdes qui pour compenser ce manque, remontent en surface, pendant la marée. Son impact est mal apprécié. En France, il ne semble pas virulent, mais on observe un pic de prévalence au cours de l'été lorsque les températures atteignent 22°C. Le développement de ce parasite dépend de paramètres environnementaux tels que la salinité et la température.

2) La Maladie de l'anneau brun et *Vibrio tapetis*

2-1 Historique et étiologie

D'avril 1987 à septembre 1988, les mortalités chroniques chez la palourde ont été associées au symptôme de l'anneau brun. La caractérisation macroscopique et microscopique de ce symptôme et son suivi sur les différents sites vénériques et nourriceries ont permis d'émettre l'hypothèse du caractère contagieux de l'anneau brun en milieu naturel, hypothèse confirmée en laboratoire par des expériences de transmissibilité. Les seuls agents infectieux systématiquement détectés dans les palourdes malades étant des microorganismes libres associés au dépôt brun, la recherche a été ciblée sur l'isolement de champignons et de bactéries pathogènes.

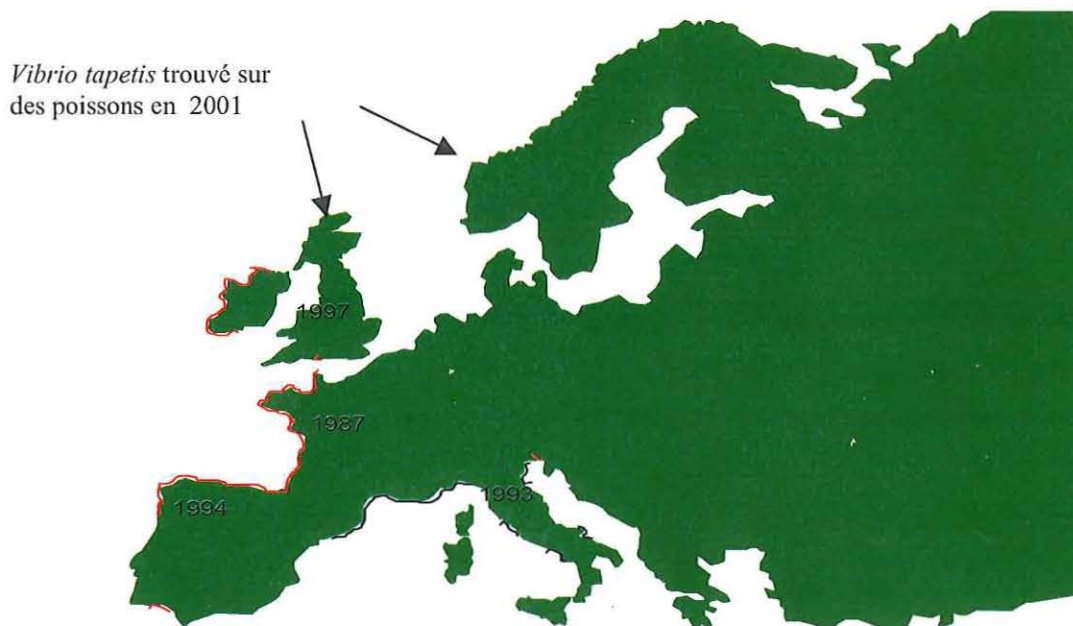
Une bactérie du genre *Vibrio*, capable de reproduire le symptôme anneau brun chez plusieurs espèces de palourdes (*R. Philippinarum* et *R. decussatus*) a ensuite été identifiée comme agent pathogène suffisant pour provoquer la maladie de l'anneau brun. Cette infection est la première dont l'origine bactérienne ait été totalement démontrée chez des bivalves adultes.

Vibrio tapetis (ou *Vibrio P1*) engendre depuis 1987 en Europe des mortalités allant de 60 à 80% dans les élevages, écloséries et bancs naturels de palourdes japonaises *Ruditapes philippinarum* et de palourdes européennes *R. decussatus* (Paillard et al., 1989 ; Borrego et al., 1996), compromettant le développement de cette filière aquacole.

2-2 Distribution géographique et espèces affectées

La maladie de l'anneau brun (MAB) est présente tout le long de la côte atlantique européenne et occasionnellement en mer Méditerranée et Adriatique. Les premières observations de la maladie de l'anneau brun ont eu lieu en France en 1987 puis en Espagne en 1994, en Angleterre en 1997 et en Irlande en 1998. La maladie a aussi été décrite dans une lagune italienne de l'Adriatique nord mais ce cas était sporadique et elle a rapidement disparu. Récemment, la MAB a été observée en Norvège (juin 2003) et en Tunisie (Janvier 2004). Jusqu'à présent, aucune observation de la MAB sur les palourdes japonaises dans leur région d'origine n'avait été rapportée ; en juin 2003, quelques spécimens présentant un important développement du symptôme ont été observés en Corée du Sud.

Vibrio tapetis affecte les mollusques du genre *Ruditapes*, *Tapes* et *Venerupis*. Il a été détecté dans les populations naturelles de *R. Philippinarum*, *R. decussatus*, *V. aurea* et *T. rhomboïdes* (Paillard et Maes 1989). L'espèce la plus sensible reste *R. Philippinarum*. Récemment, *V. tapetis* a été isolé sur deux poissons après un épisode de mortalité, le Crénilabre commun, *Symphodus melops* en Norvège (Jensen et al. 2003) et le flétan, *Hipoglossus hipoglossus* en Ecosse (Reid et al. 2003) (voir figure 3).



**Figure 3 : Répartition géographique des souches de *V. tapetis* isolées en Europe
(Dessin :Présentation Christine Paillard)**

2-3 Etude clinique

L'agent pathogène *V. tapetis* perturbe les processus initiaux de la croissance coquillière en adhérant aux matrices organiques sur lesquelles devrait normalement s'effectuer la bio-minéralisation du calcium. Ces matrices organiques dégradées, au lieu de contribuer à la croissance coquillière, se déposent sur la face interne des valves produisant ainsi le symptôme de l'anneau brun (Paillard et Le Pennec, 1993 ; Paillard et al., 1994).

Cette bactérie n'a jamais été détectée dans les tissus. Elle est localisée essentiellement dans les compartiments extrapalléaux à la surface des épithéliums du manteau et des sécrétions coquillières (Paillard et Maes, 1995 a et b ; Allam et al., 1996). L'inoculation de *V. tapetis* à *R. philippinarum* induit des variations au niveau des paramètres hémolymphatiques et des fluides extrapalléaux (Oubella et al., 1996; Allam et Paillard, 1998 ; Allam et al., 2000). Les palourdes infectées ont également une diminution importante de leur réserve en glycogène, suggérant que les mortalités peuvent résulter d'une dégénérescence de l'activité métabolique.

2-4 Facteurs environnementaux influençant la maladie

Les principaux facteurs influençant la maladie sont :

- La température : *Vibrio tapetis* ne se cultive pas à 27°C et est rapidement tué à 30°C dans l'eau de mer. Des études expérimentales ont confirmé l'effet significatif de la température sur le développement de la MAB. Jusqu'à présent, cette maladie était observée préférentiellement en mars. Depuis 2-3ans, des pics plus importants sont observés en automne.
- La salinité peut également affecter la fréquence de la MAB. Des études expérimentales ont montré qu'une baisse de la salinité augmente la fréquence de détection de la MAB.

2-5 L'agent *Vibrio tapetis*

L'analyse des caractères phénotypiques et génétiques (détermination du G + C %, homologies ADN - ADN) montre que cette bactérie est distincte des autres espèces du genre *Vibrio* et qu'elle forme une nouvelle espèce, *Vibrio tapetis*.

Elle présente les caractéristiques du genre *Vibrio* : bâtonnet incurvé (voir figure 4) ; Gram - ; mobile ; sans spore ; fermentant le glucose ; oxydase + ; à croissance inhibée par le O/129, halophile (la culture nécessite 1 à 3 % de NaCl mais n'a pas lieu pour des concentrations supérieures à 5 %), se cultivant sur des géloses trypticase soja contenant 2 % de NaCl (ou sur le milieu Difco marine agar). Ces colonies sont circulaires, translucides, non pigmentées. La culture est observée pour des températures d'incubation comprises entre 4 et 22 °C et l'optimum thermique est de l'ordre de 18 °C.

Une réponse positive est obtenue pour les tests ONPG, indole, hydrolyse de la caséine, de la gélatine, de l'amidon et du Tween 80, acidification du D-fructose, du D-glucose, du D-galactose, du D-mannose, de la N-acétylglucosamine et du maltose.

Un résultat négatif est obtenu avec les tests uréase, VP, H₂S, ADH, LDC, ODC, acidification du L-arabinose, du myo-inositol, du lactose, du mannitol, du D-mélibiose, du L-rhamnose, du saccharose et du D-sorbitol.

La capacité de croissance à + 4 °C, une réponse positive aux tests ONPG et indole, une réponse négative aux tests de croissance à 30 °C et une croissance en présence de 6 % de NaCl, ADH, LDC, ODC et VP permettent de distinguer *Vibrio tapetis* des autres *Vibrio* (voir tableau 2).

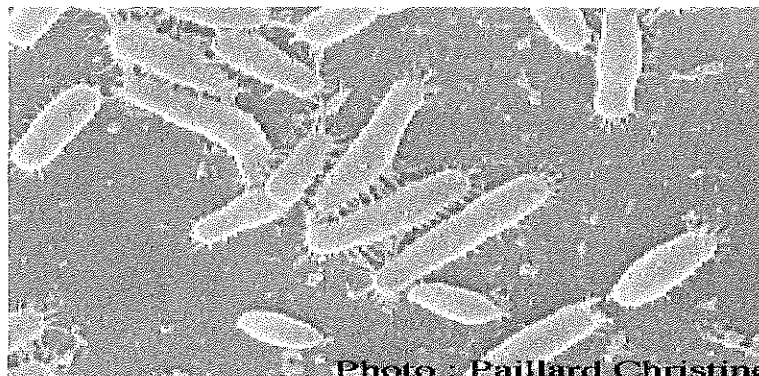


Figure 4 : Photographie de *V. tapetis* vue au microscope électronique à balayage

Utilisation :		Enzymes :		Croissance :	
Saccharose	-	Arginine-dihydrolase	-	à 4°C	+
Arabinose	-	Lysine-décarboxylase	-	18°C	+
Melibiose	-	Ornithine décarboxylase	-	30°C	+
Fructose	+	Tryptophane-désaminase	-	NaCl 0%	-
Glucose	F	B-galactosidase	+	NaCl 1%	+
Maltose	+	Nitrate réductase	+	NaCl 5%	+
Rhamnose	-	Oxydase	+	NaCl 10%	-
Galactose	+	Catalase	+	Sur TCBS	+
Mannose	+	Uréase	-	O/129	-
Sorbitol	-	Gélatinase	+		
Glycérol	+/-	Amylase	+		
Inositol	-	Alginase	-		
Manitol	-				
Citrate	-	Production :			
Gluconate	-	Indole	+		
Caprate	-	Acétoine (VP)	-		
Adipate	-	H ₂ S	-		
Malate	+				
Phényl-acétate	-				
Esculine	+				
Amygdaline	-				
N-acétyl-glucosamine	+				

Tableau 2 : Tests biochimiques et de croissance effectués sur Vibrio tapetis

(+ : utilisation, présence, croissance ; - : non utilisation, absence, croissance non détectée ; +/- : utilisation lente ; F : fermentation)

2-6 Diagnostic

Macroscopique :

Le syndrome connu sous le nom de Maladie de l'anneau brun, doit son nom au plus évident de ses symptômes, un dépôt organique brunâtre.

Sous sa forme la plus évidente, le dépôt brun est parfaitement visible à l'œil nu. Il est alors constitué de nombreuses lamelles organiques empilées, ce qui lui confère une structure feuilletée et une coloration d'autant plus brune qu'il est épais.

Souvent le dépôt n'est pas aussi net et l'utilisation de la loupe binoculaire devient nécessaire pour sa détection. Deux indices présents simultanément ou séparément, permettent alors de l'identifier :

- ⇒ Un film organique constitué d'une ou plusieurs lamelles de coloration brun clair et adhérent fortement au bord interne de la coquille.
- ⇒ De petites taches brunes entourées d'auréoles concentriques plus claires, disposées en séries radiales, et adhérent au bord interne de la coquille (voir figure 5).



Figure 5 : Photographie d'une coquille de palourde arborant les premiers signes de la maladie de l'anneau brun (Photo : Christine Paillard)

Recherche de *Vibrio tapetis* :

Isolement

Les caractéristiques phénotypiques clés spécifiques de *V. tapetis* sont la non utilisation du saccharose et du mannitol sur TCBS (Milieu spécifique des Vibrionacées) et l'absence de croissance au dessus de 28°C. Ces tests sont réalisés sur milieu gélosé selon la méthode des répliques développée par Maes (1992). Chacune des souches est d'abord cultivée sur milieu de Zobell à 18°C. Après croissance, une réplique de cette culture est réalisée à l'aide d'un velours stérile sur une série de 4 milieux gélosés : du ZMB (Zobell Mannitol Bleu de Bromothymol pour tester l'utilisation du mannitol), du TCBS (Thiosulfate Bile Saccharose pour tester la croissance sur TCBS et l'utilisation du saccharose) et deux boîtes de Zobell, l'une incubée à 30°C (pour tester l'absence de croissance à cette température), l'autre à 18°C qui sert de témoin positif des répliques.

Séro-agglutination

La nature antigénique des bactéries est testée à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-VP1, produit grâce à des injections de cellules fixées au formol chez un lapin. Les tests d'agglutination sont réalisés sur une lame de téflon. L'agglutination est ensuite observée à la loupe binoculaire.

PCR

Une méthode de détection moléculaire de *V. tapetis* a été développée par Paillard et al (2005). C'est celle que j'utiliserai lors de mon stage.

2-7 Moyens de lutte – contrôle des maladies

(Prophylaxie : Mesures prises pour protéger la santé et éviter la diffusion des maladies)

a) Prophylaxie médicale

En conchyliculture, la prophylaxie médicale n'est pas applicable.

- Les traitements médicamenteux sont à proscrire en raison des caractéristiques d'élevage :
 - Milieu ouvert → Recontamination très probable
 - Il faudrait des grandes quantités de substances actives
 - Accumulation de résidus dans le milieu
- La vaccination n'est pas possible en raison de l'absence de système de défense adaptatif inductible (pas de cellule mémoire).

b) Prophylaxie sanitaire

Elle peut reposer :

- Sur un diagnostic rapide des maladies infectieuses pour limiter leur dissémination
 - ☞ nécessité de développer des outils de diagnostics rapides, fiables, sensibles et spécifiques.
- L'obtention d'animaux plus résistants aux maladies infectieuses par sélection génétique.
- La surveillance des espèces en élevage et gisement pour prévenir l'introduction et la propagation d'agents pathogènes (ex : le réseau REPAMO).

c) Le réseau REPAMO

Le réseau REPAMO (RÉseau de PATHologie des MOllusques), a été créé en 1986 à l'initiative d'IFREMER afin d'assurer la surveillance de l'état de santé des coquillages du littoral français métropolitain, qu'ils soient sur gisements naturels ou en élevage (voir figure 6). Par la suite, l'Etat français a chargé officiellement IFREMER de cette mission de surveillance afin de répondre aux obligations de la législation européenne (Directive 91/67/CEE du 28 janvier 1991 et Directive 95/70/CE du 22 décembre 1995).

Les activités du réseau REPAMO font parties des missions institutionnelles de l'IFREMER. Les objectifs du réseau sont de prévenir l'introduction et la propagation d'agents pathogènes, en particulier ceux à déclaration obligatoire, et de surveiller l'évolution de ceux déjà présents sur le territoire national.

La surveillance assurée par le réseau REPAMO se décline en quatre thèmes :

- Suivi des maladies à déclaration obligatoire officiellement présentes en France : la bonamiose due à *Bonamia ostreae* et la marteiliose due à *Marteilia refringens*
- Surveillance zoosanitaire des populations élevées et sauvages de mollusques
- Etude des cas de mortalités anormales
- Contrôle de transferts de mollusques vivants

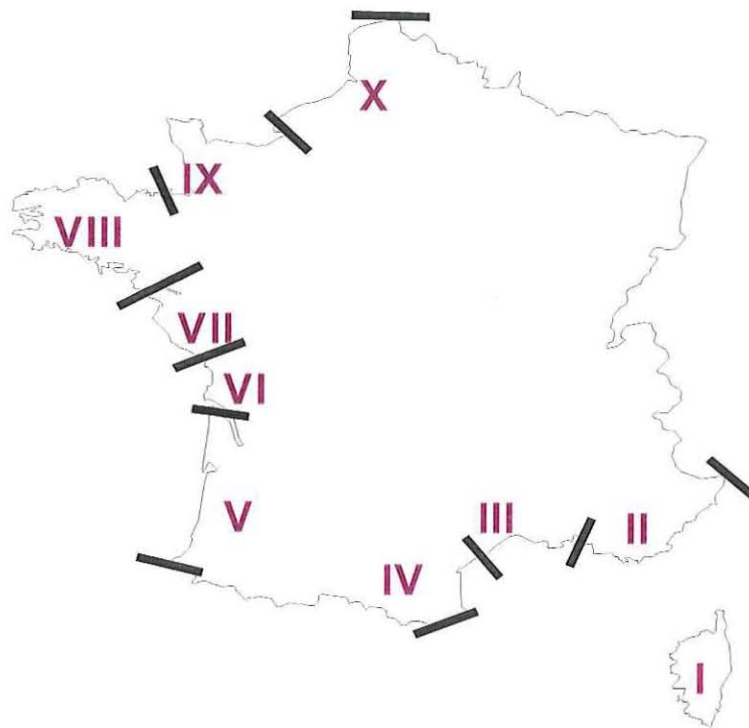


Figure 6 : Les 10 zones du littoral français dans le cadre de la surveillance réalisée par le réseau REPAMO

Zone I : étang d'Urbino et étang de Diane (Corse).

Zone II : de la frontière italienne à la rive gauche du Rhône.

Zone III : de la rive droite du Rhône à la rive gauche de l'Aude.

Zone IV : de la rive droite de l'Aude à la frontière espagnole.

Zone V : de la frontière espagnole à la rive gauche de la Gironde (Bassin d'Arcachon).

Zone VI : de la rive droite de la Gironde à la rive gauche de la Sèvre niortaise (Charente Maritime).

Zone VII : de la rive droite de la Sèvre niortaise à la rive gauche de la Loire.

Zone VIII : de la rive droite de la Loire à la rive gauche du Couesnon (Bretagne).

Zone IX : de la rive droite du Couesnon à la rive gauche de la Seine.

Zone X : de la rive droite de la Seine à la frontière belge.

3) Contexte du stage

Dans le cadre du réseau REPAMO, une surveillance zoosanitaire des populations élevées et sauvages de mollusques est effectuée.

L'objectif de la surveillance zoosanitaire de ces populations est d'obtenir des informations sur l'état zoosanitaire des coquillages en dehors des situations de crise (mortalités), ceci afin de sécuriser les échanges commerciaux, de dresser une image de référence du littoral français en matière de pathologie des mollusques et de répondre aux obligations réglementaires de la Directive 95/70/CE.

En 2004-2005, cette surveillance concerne les deux espèces de palourdes (*R. Philippinarum* et *R. decussatus*) car il est apparu après étude des données antérieures du réseau Repamo, que l'effort de surveillance sur les palourdes n'avait pas été constant dans le temps et dans l'espace.

Cette surveillance ciblait particulièrement un des agents pathogènes des palourdes *P. olsenii* dont la meilleure période de détection est en fin d'été en France. En parallèle, des prélèvements pour rechercher *Vibrio tapetis*, ont été effectués à cette même période car cette bactérie est fréquemment détectée en automne depuis 2-3 ans.

Mon stage s'inscrit dans une des missions du réseau Repamo ; il a pour objectif de donner une image de la répartition de *V. tapetis* sur la côte atlantique en période automnale.

III) MATERIEL ET METHODE

1) Echantillonnage

5 points de prélèvements de 30 individus par secteur ont été réalisés (150 individus par secteur, nombre permettant de détecter une prévalence minimum de 2% pour un intervalle de confiance de 95%).

Ainsi, 6 secteurs ont été identifiés sur l'ensemble du littoral (voir figure 7) :

- Chausey (élevage)
- Golfe du Morbihan (gisement naturel)
- Rivière d'Auray (gisement naturel)
- Arcachon (gisement naturel)
- Etang de Salse Leucate (gisement naturel)
- Etang de Thau (gisement naturel)

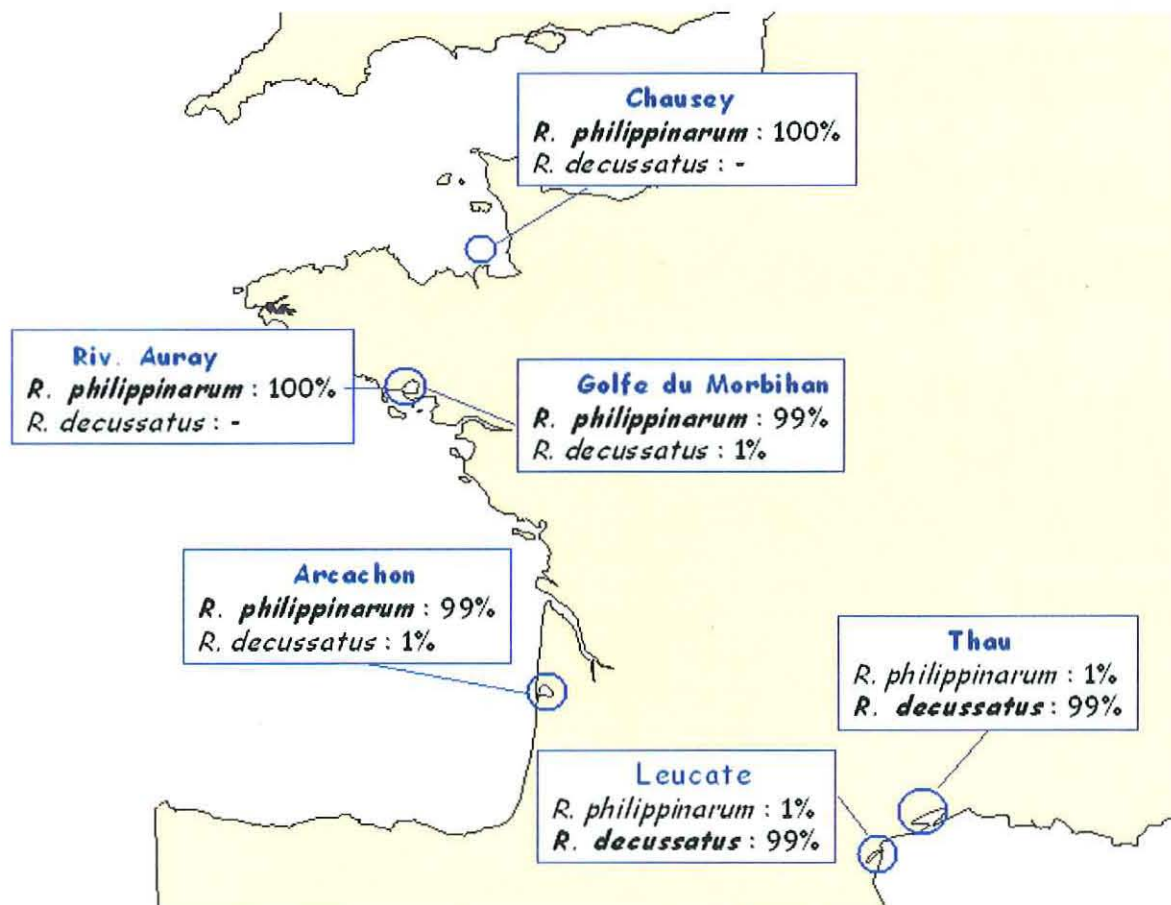


Figure 7 : Répartition géographique des secteurs d'échantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé dans chacun de ces secteurs en septembre-octobre 2004. Seul les secteurs de Chausey, du Golfe du Morbihan et d'Arcachon ont été traités lors de mon stage.

(Voir annexes I pour le détail des secteurs et des points de prélèvement)

2) Prélèvement du fluide extrapalléal

Les palourdes sont ouvertes et les fluides extrapalléaux et centraux sont prélevés à la seringue, après décollement de l'impression palléale par l'aiguille au niveau sinusal (voir figures 8 et 9).



Figure 8 : Prélèvement du fluide extrapalléal

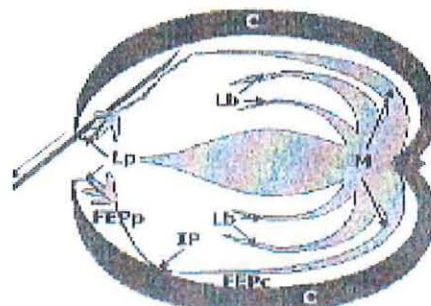


Figure 9 : Schéma du prélèvement du fluide extrapalléal

C : Coquille ; M : manteau ; Lb : Lame branchiale ; Lp : Lame périostracale ; IP : Impression palléale

3) Extraction d'ADN

J'ai utilisé 3 méthodes d'extraction différentes lors de mon stage :

3-1 Méthode Chelex:

Le Chelex est une résine chélatrice qui a une haute affinité pour les ions bivalents métalliques.

Pendant l'ébullition, il inhibe l'action des ions métalliques qui peuvent agir comme catalyseurs des Dnases cellulaires, mises en contact avec l'ADN suite à la destruction des parois cellulaires sous la double action du choc thermique et de la protéinase K.

Tout l'ADN des échantillons qu'il soit bactérien ou de palourde est extrait par la technique Chelex (selon protocole de Saulnier et al., 2000), particulièrement adaptée aux fluides et suspensions.

1. Les échantillons conservés à -20°C sont décongelés.
2. Ils sont ensuite centrifugés 10 minutes à $10000g$ à 4°C .
3. Le surnageant de chaque échantillon est éliminé afin de récupérer le culot contenant les cellules.
4. Le culot de chaque échantillon est suspendu dans $400\ \mu\text{l}$ de Chelex 5%. Le Chelex est composée de billes de résine de chélation et doit être maintenu sous agitation pendant la durée de la manipulation pour que la solution reste homogène.

5. 50 μ l de Protéinase K à 25 μ g/ml est ajouté dans chaque échantillon et la solution est homogénéisée.
6. Les échantillons sont ensuite placés pendant 4h (minimum) à 56°C.
7. Puis ils sont chauffés 10 minutes à 100°C puis placés immédiatement après dans la glace.
8. Les échantillons peuvent être utilisés ainsi pour la PCR ou ils peuvent être congelés à -20°C après avoir repris le surnageant.

3-2 Méthode phénol chloroforme :

1. 150 μ l de liquide extrapalléal est centrifugé pendant 10 minutes à 10 000g à 4°C.
2. 200 μ l de tampon de lyse (NaCl 100 mM, Tris 10 mM, EDTA 25 mM, SDS 0.5%, pH 8) additionné de protéinase K (0.2 mg/ml) sont ajoutés.
3. Les échantillons sont incubés 3 heures au minimum dans un bain-Marie à 56°C.
4. 400 μ l de solution de phénol chloroforme est ajouté. La solution est mélangée pendant 15 secondes puis centrifugée (10 000 g, 20 minutes, 20°C). Trois phases sont alors mises en évidence : la phase phénolique au fond, contenant les lipides, la phase protéique (ou interphase) formant une galette blanche où se trouvent les protéines retenues par le phénol et la phase aqueuse contenant les acides nucléiques qui est prélevée puis transférée dans un nouveau tube.
5. L'étape 4 est répétée pour éliminer les protéines restantes.
6. Au surnageant, sont cette fois-ci ajoutés 200 μ l de chloroforme afin d'éliminer les traces de phénol. Les échantillons sont mélangés 15 secondes puis centrifugés (10 000 g, 20 minutes, 20°C). Le surnageant est prélevé et transféré dans un nouveau tube.
7. Au volume de surnageant V, est ajouté 0.1 V d'acétate de sodium à 3 M et pH 5.4 et 2.5 V d'éthanol absolu afin de précipiter les acides nucléiques.
8. Après homogénéisation, les tubes sont incubés 1 heure à -20°C afin d'accélérer la précipitation. Les échantillons sont ensuite centrifugés (10 000 g, 20 minutes, 4°C).
9. Le surnageant est éliminé. Le culot est rincé avec 2 volumes d'éthanol à 70°. Le tout est centrifugé (10000g, 10 minutes, 4°C).
10. Le surnageant est à nouveau éliminé. Le culot est ensuite séché en plaçant les tubes ouverts dans une étuve à 50-60°C ou à l'air libre.
11. Le culot est repris dans 20 μ l d'eau.

Les déchets toxiques tels que le phénol chloroforme et le chloroforme sont récupérés dans des bidons spéciaux réservés à ces types de produits dangereux. Leur manipulation nécessite le port de gants appropriés en nitrile et le travail sous hotte ventilée.

3-3 Méthode d'extraction avec des kits Quiagen® :

1. 200µl de fluide extrapalléal de palourde sont prélevés et placés dans un tube de 1,5ml auquel on ajoute 20µl de protéinase K catalysés par 200µl de tampon AL.
2. La solution est mélangée pendant 15 secondes, puis incubée 10 minutes à 56°C.
3. Elle est ensuite centrifugée brièvement avant d'y ajouter 200µl d'éthanol pur. La solution est homogénéisée pendant 15 secondes puis centrifugée une seconde fois pour la faire redescendre dans le tube.
4. Le mélange est ensuite transféré dans un tube-colonne de 2ml. Le bouchon est fermé puis le tube-colonne est centrifugé à 8000 tours par minute pendant une minute. La colonne est ensuite placée dans un nouveau tube et le tube contenant le filtrat est jeté.
5. 500µl de tampon AW1 est ajouté dans la colonne qui est centrifugée à 8000 tours par minute pendant une minute. Elle est ensuite placée dans un nouveau tube et le tube contenant le filtrat est jeté.
6. 500µl de tampon AW2 est ensuite ajouté dans la colonne qui est centrifugée à 14000 tours par minute pendant 3 minutes.
7. La colonne est ensuite placée sur un tube de 1,5ml et le tube contenant le filtrat est jeté. 50µl d'eau distillée est ajouté, l'ensemble est incubé 1 minute à température ambiante.
8. Le tube-colonne est centrifugé à 8000 tours par minute pendant une minute.
9. Le filtrat contient donc l'ADN extrait et la colonne est jetée.

On réalise alors une vérification de la qualité de l'extraction et de la quantité d'ADN par spectrophotométrie UV (Ultraviolet) :

L'ADN et les protéines absorbent dans le domaine de l'ultraviolet à des longueurs d'ondes respectives de 260 et 280 nanomètres. On vérifie la contamination par les protéines de l'extrait d'ADN à l'aide du rapport DO (Densité Optique) 260 / DO 280 (ADN / Protéines). Sa valeur doit être comprise entre 1,7 et 2. Une valeur proche de 1,7 indique une probable contamination en protéines.

Le spectrophotomètre permet également de quantifier l'ADN grâce à la DO à 260 nm.

La concentration (C) en ADN de l'échantillon est calculée en µg/µl selon la formule suivante, sachant que le coefficient 50 (en µg/µl d'ADN) correspond à une DO égale à 1:

$$C = DO\ 260 \times 50 \times (\text{dilution} / 1000)$$

Cette vérification s'effectue dans une cuve en quartz.

4) L'amplification par polymérisation en chaîne (PCR)

4-1 Définition

L'amplification par polymérisation en chaîne est une technique de biologie moléculaire, mise au point en 1985 par KARRY MULLIS. Cette technique permet d'amplifier spécifiquement et de façon exponentielle un fragment d'acide nucléique situé entre deux séquences connues, c'est-à-dire qu'elle permet de repérer un fragment d'ADN ou de gène précis, même présent en quantité infime dans un mélange puis de le multiplier rapidement. Elle repose notamment sur l'utilisation d'amorces spécifiques du fragment nucléique à amplifier ainsi que sur une ADN polymérase thermorésistante : la Taq polymérase, enzyme issue de bactéries thermophiles vivant dans des sources d'eau chaude tel que *Thermus aquaticus*. Cette enzyme a la particularité de rester stable aux températures élevées nécessaires aux étapes de dénaturation (94°C) de l'ADN.

4-2 Principe général de la PCR

Une PCR classique se déroule dans un tube qui est placé dans un appareil programmable appelé thermocycleur. Le thermocycleur permet de placer le tube aux températures voulues pendant des durées programmées et de recommencer en effectuant des cycles. Un cycle reproduit trois températures différentes pendant des durées données. La durée d'un cycle est de l'ordre de la minute.

Avant la réaction, tous les réactifs de la PCR sont introduits dans le même tube. Il s'agit de l'ADN à amplifier, des oligonucléotides (ou amorces) spécifiques du segment d'ADN voulu, de l'ADN polymérase (ici la Taq polymérase), de la solution tampon additionné de MgCl₂ et enfin du mélange des quatre désoxyribonucléotides constitutifs de l'ADN. Tous sont ajoutés en large excès par rapport à l'ADN.

Chaque cycle de PCR est constitué de trois phases différentes à trois températures différentes, la dénaturation, l'hybridation (ou anelage) et l'élongation (ou extension des amorces) (voir figure 10).

Le premier cycle

Il permet de synthétiser autant de brins complémentaires (plus courts puisque bornés par une amorce) que de brins cibles présents dans le tube. Ils deviennent à leur tour des ADN cibles.

Le deuxième cycle

La quantité d'ADN continue de doubler et les premiers brins, dont la taille est limitée par les deux amorces, font leur apparition.

Le troisième cycle

Les premiers amplicons apparaissent, ADN double brins bornés par les amorces, correspondant au fragment d'ADN recherché. La taille des fragments varie généralement de 50 paires de bases (pb) à 2 kilo bases (Kb).

Au fil des cycles, la quantité d'amplicons va augmenter de façon exponentielle. On peut réaliser une trentaine de cycles sans modifier le mélange réactionnel. Au-delà, la Taq polymérase perd de son activité à cause des étapes répétées de dénaturation de l'ADN. On obtient, en théorie 2ⁿ copies pour n cycles. Dans la pratique, pour un rendement classique de 85%, une PCR de 30 cycles produit environ 10⁶ copies (amplicons de taille attendue).

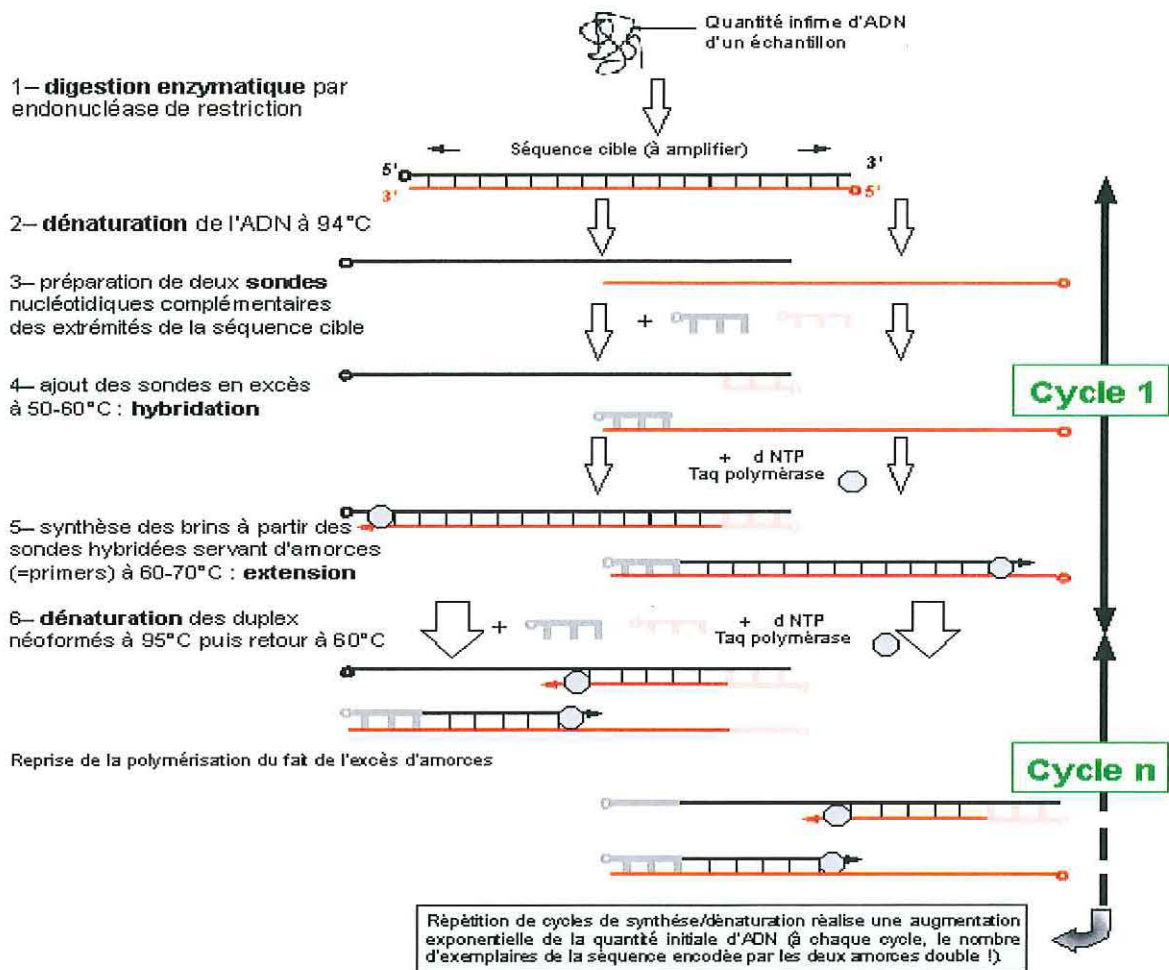


Figure 10 : Schéma général de la PCR

4-3 PCR Universelle 16 S

La PCR universelle permet de savoir si l'ADN a bien été extrait et s'il n'a pas été dégradé.

Pour l'ADN bactérien, on utilise des amorces correspondant à des portions d'ADN codant pour la petite sous unité ribosomale 16S et dénommées (voir tableau 3) :

- Amorces AS dir: AGAGTTTGATCATGGCTCAGA (21 bases)
- Amorces S17 rev: GTTACCTTGTTACGACTT (18 bases)

Mix	1 Tube (µl)
H ₂ O	42,8
Tp 10X	5
d NTPs (20Mm)	0,5
Amorces S17	0,1
Amorces ASgyr	0,1
Taq <i>biolabe</i> ®	0,5

Tableau 3 : Mélange réactionnel de la PCR universelle 16S

A ces 49 µl de mélange réactionnel, 1 µl d'échantillon est ajouté.
A chaque analyse, deux témoins négatifs (T-) et un témoin positif (T+) sont incorporés.

Les témoins négatifs correspondent à :

- 49 µl de mélange réactionnel
- 1 µl d'H₂O

Ils permettent de détecter d'éventuelles contaminations des réactifs ou de la zone de travail au cours des manipulations.

Le témoin positif correspond à :

- 49 µl de mélange réactionnel
- 1 µl d'ADN bactérien de type *Vibrio tapetis*

Ce témoin positif permet de vérifier l'efficacité du milieu réactionnel et la qualité de la réaction de PCR.

L'amplification des séquences cibles se fait dans un thermocycleur, grâce aux étapes suivantes :

- x 34 cycles
- étape 1 : 3 min à 94°C
 - étape 2 : 1 min à 94°C
 - étape 3 : 1 min à 50°C
 - étape 4 : 2 min à 72°C
 - étape 5 : 10 min à 72°C

4-4 PCR spécifique *Vibrio tapetis*

La PCR pour la détection de *Vibrio tapetis* est réalisée grâce à l'association des deux amorces suivantes permettant d'amplifier spécifiquement un fragment de 415 bp dans l'ADNr 16S de *Vibrio tapetis*, de la 41^e à la 456^e base :

- Amorce SSPVtF (forward) : CGAGCGGAAACGAGAAGTAG (41^e → 61^e base)
- Amorce SSPVtR (reverse) : GGATGCACGCTATTAACGTACA (435^e → 456^e base)

Chaque amorce peut reconnaître d'autres espèces de vibrio mais ces espèces sont absentes des côtes européennes puisque typiquement asiatiques.

L'association des 2 amorces a été testée sur 52 bactéries et a été prouvée spécifique à *Vibrio tapetis* (Paillard et al. 2005) (voir tableau 4).

Mix	1 Tube (µl)
H ₂ O	43,1
Tp 10X	5
d NTPs (pur)	0,5
Amorces VtF	0,1
Amorces VtR	0,1
Taq <i>biolabe</i> ®	0,2

Tableau 4 : Mélange réactionnel de la PCR spécifique *Vibrio tapetis*

Comme précédemment, aux 49 µl de mélange réactionnel, 1 µl d'échantillon est ajouté, et à chaque analyse, deux témoins négatifs (T-) et un témoin positif (T+) sont incorporés.

L'amplification des séquences cibles se fait dans un thermocycleur, grâce aux étapes suivantes :

- Pré PCR
 - étape 1 : 3 min à 94°C
 - étape 2 : 2 min à 63°C
 - étape 3 : 1 min à 72°C
 - PCR
 - étape 4 : 1 min à 94°C
 - étape 5 : 1 min à 63°C
 - étape 6 : 45 secondes à 72°C
 - étape 7 : 10 min à 72°C
- } x 35 cycles

5) Gel - Révélation

L'ADN amplifié est ensuite visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose additionné de bromure d'Ethidium (BET). Le BET est un agent intercalant, c'est-à-dire qu'il peut s'intégrer entre les bases de l'ADN. Il prend une coloration orange fluorescente sous UV, ce qui permet alors de visualiser l'ADN amplifié. Si les produits d'amplification sont en quantité suffisante, ils apparaissent sous la forme d'une bande orange fluorescente. La vitesse de migration étant dépendante de la masse moléculaire, donc du nombre de bases de l'ADN testé, la présence et la taille des amplicons pourront être vérifiées.

Afin de déterminer la taille de ces produits, un marqueur de poids moléculaire est également déposé.

Pour *V. tapetis*, la taille du fragment attendu est de 415 pb (voir figure 11).

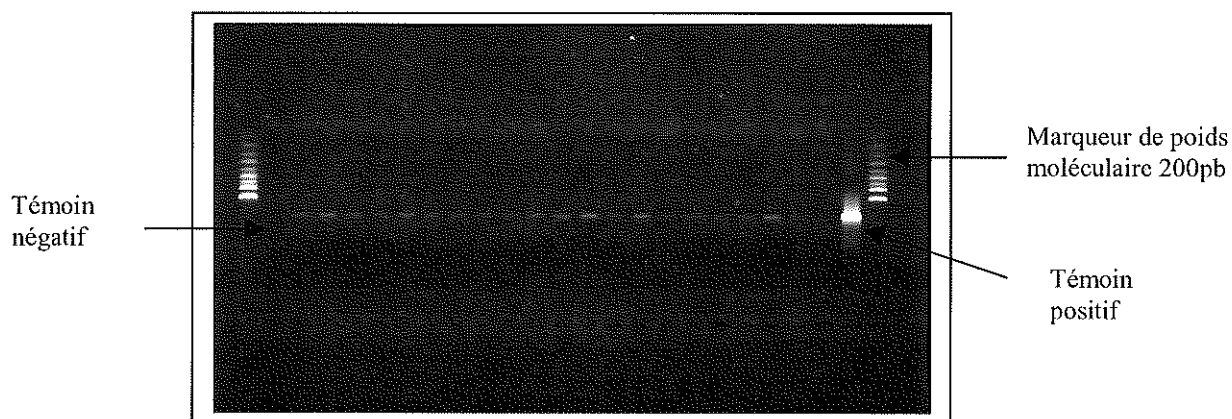


Figure 11 : Photo d'une électrophorèse de PCR spécifique

IV) RESULTATS ET DISCUSSION

1) PCR universelle

1-1 Résultats et problèmes rencontrés

La PCR universelle est employée pour vérifier l'intégrité de l'ADN extrait et savoir s'il est amplifiable.

Un échantillon est positif si on observe après migration sur le gel d'agarose et exposition au UV un trait orange fluorescent au même niveau que le témoin positif (voir figure 12).

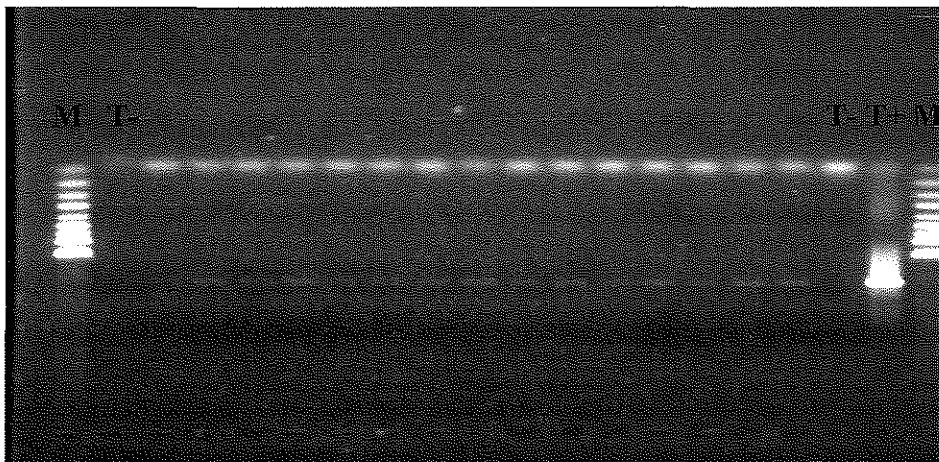


Figure 12 : Exemple de résultats d'analyse en PCR universelle avec les couples d'amorces S17 et ASgyr, sur les échantillons 16 à 30 du lot 05/009
(M : marqueur de poids moléculaire 200 pb, T- : témoin négatif, T+ : témoin positif)

Sur 205 individus traités, 94% des échantillons présentent un produit d'amplification et 13 d'entre eux n'ont pas permis d'obtenir d'amplification en PCR universelle. Les résultats sont présentés sous forme d'un tableau (**voir annexe II**).

Les 13 échantillons pour lesquels aucune amplification n'est visible en PCR universelle, sont les suivants :

- Lot 04/086 : n° 7,13 et 27
- Lot 05/011 : n° 4,17 et 27
- Lot 04/097 : n° 30
- Lot 04/105 : n° 6,12 et 13
- Lot 04/076 : n° 25
- Lot 05/009 : n° 6 et 10

Il est important de noter que la plupart des échantillons négatifs en PCR universelle, sont des échantillons qui faisaient moins de 50 µl ou qui ont pris l'eau lors de l'extraction par la méthode Chelex.

Durant mon premier mois de stage, j'ai rencontré des difficultés avec les lots 04/085, 04/086, 04/071 et 04/106. Aucune amplification n'était observée en PCR universelle empêchant ainsi de réaliser une PCR spécifique *Vibrio tapetis*. Il m'a donc fallu résoudre ces problèmes et pour cela, optimiser la PCR universelle.

1-2 Optimisation de l'extraction

Nous avons émis plusieurs hypothèses quant aux raisons de l'obtention de ces résultats négatifs en PCR universelle :

- Le protocole d'extraction :

J'ai d'abord pensé que le protocole d'extraction au Chelex 5% n'était pas efficace. J'ai donc décidé d'utiliser deux autres méthodes d'extraction d'ADN, le phénol chloroforme (sur les échantillons 26 à 30 du lot 04/085) et des kits d'extraction Quiagen® (sur les échantillons 18 à 23 du lot 04/085 à partir de 200 µl d'échantillon, sur les échantillons 26 à 30 du lot 04/085, à partir du culot de 200 µl d'échantillon après centrifugation et sur les échantillons 07 à 10 du lot 04/086 incubés toute la nuit à 56°C au lieu de 10 min).

Aucune de ces extractions n'a permis d'amplifier l'ADN en PCR universelle malgré une concentration en ADN convenable après quantification par spectrophotométrie.

- L'état des échantillons :

La deuxième hypothèse fut que les échantillons avaient été altérés par la congélation (observation de floculation blanche dans les tubes). Nous avons donc échantillonné un lot de 30 palourdes sur l'île d'Oléron (lot 05/009) sur lesquelles nous avons prélevé le liquide extrapalléal. Une partie du liquide a été congelé à -20°C, et l'autre traitée immédiatement. J'ai réalisé une extraction d'ADN par la méthode Chelex 5% à partir de 100 µl de liquide extrapalléal. Tous les échantillons ont été positifs en PCR universelle.

Après 15 jours de congélation à -20°C, j'ai réalisé une extraction d'ADN par la méthode Chelex 5% à partir de 100 µl de liquide extrapalléal suivie d'une PCR universelle. Il s'est avéré que tous les échantillons étaient encore une fois positifs.

Par conséquent, cette expérience a montré que le protocole d'extraction par Chelex 5% était efficace et que la congélation n'avait en aucun cas altéré l'ADN des échantillons.

- Présence d'inhibiteurs

Au vue des résultats précédents, la troisième hypothèse émise fut la présence d'inhibiteurs de la réaction de PCR dans certains lots. Pour essayer d'y remédier, j'ai laissé agir le Chelex et la protéinase K soit pendant 6h30 soit toute une nuit à 56°C au lieu des 4 heures préconisées par le protocole original, sur les échantillons 06 à 30 du lot 04/086 (lot dont l'extraction n'avait pas donné de résultat avec les autres méthodes d'extraction ainsi que le Chelex 5%).

Tous les échantillons mis à part le 07, le 13 et le 27 furent positifs en PCR universelle.

La présence d'inhibiteurs dans les lots 04/085, 04/086, 04/071 et 04/106 a sans doute entraîné une réponse négative en PCR universelle. Ainsi, pour optimiser la PCR universelle, il est recommandé de laisser incuber le Chelex et la protéinase K toute une nuit à 56°C afin de réduire ou annuler l'action des inhibiteurs de la réaction de PCR.

2) PCR spécifique *Vibrio tapetis*

2-1 Résultats

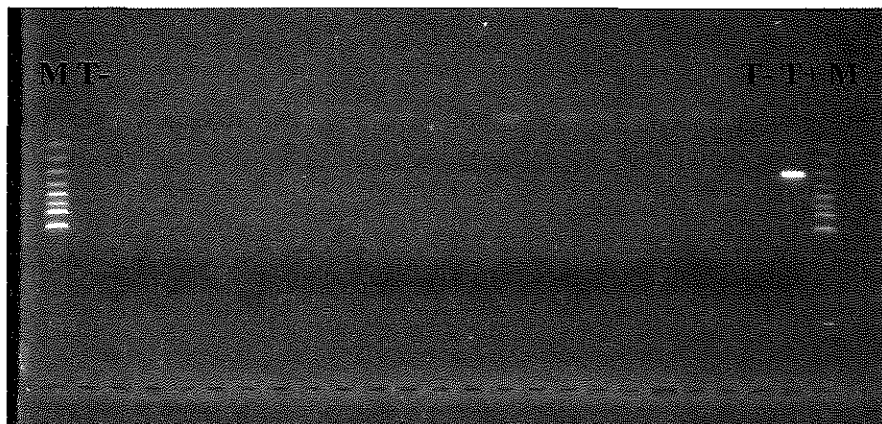


Figure 13 : Exemple de résultat d'analyse en PCR spécifique *Vibrio tapetis* avec les couples d'amorces VtF et VtR, sur les échantillons 01à15 du lot 04/097
(M : marqueur de poids moléculaire 200 pb, T- : témoin négatif, T+ : témoin positif)

Sur 192 individus traités, aucun d'entre eux n'a permis d'obtenir une amplification par PCR spécifique *Vibrio tapetis* (voir figure 13).

Les résultats sont présentés sous forme de tableau (voir annexe III).

D'après les résultats de la PCR il n'y avait pas présence de *Vibrio tapetis* dans les palourdes au moment du prélèvement des échantillons dans les lots 04/086, 04/072, 05/011, 04/097, 04/105, 04/076, 04/073 et 05/009.

2-2 Comparaison avec les observations macroscopiques

Lors de l'observation macroscopique des coquilles des différents lots traités en PCR, les symptômes de la maladie de l'anneau brun ont pu être observés sur 21 individus mais dans chaque cas l'anneau brun avait été recouvert par une couche de nacre ; un processus de cicatrisation avait eu lieu (voir annexe IV).

Selon Christine Paillard, des réparations des lésions coquillières peuvent être observées. Elles apparaissent comme des protubérances de nacre à la surface interne des valves. La réaction de défense vis-à-vis de *Vibrio tapetis* localisée entre le manteau et le bord de la coquille se déroulerait en deux temps : l'enrobage individuel puis collectif des bactéries à l'intérieur de matrices organiques, suivi du processus de réparation coquillière destinée à recouvrir le dépôt brun (voir figure 14).

Ainsi, il n'est pas étonnant de ne pas avoir détecté *Vibrio tapetis* par PCR spécifique sur les échantillons présentant un anneau brun cicatrisé. La bactérie avait dû être éliminée ou détruite par les palourdes (voir figure 15).



Figure14 : Photographie d'anneau brun recouvert de nacre.



Figure 15 : Photographie d'une palourde présentant le syndrome de l'anneau brun en phase de cicatrisation.

Sur deux palourdes j'ai pu également observer une déformation de la coquille (voir figure 16) due à la présence d'un dépôt (anneau brun) entraînant une perturbation de la croissance coquillière, signe qu'il y a bien eu présence de *Vibrio tapetis* à un moment donné.

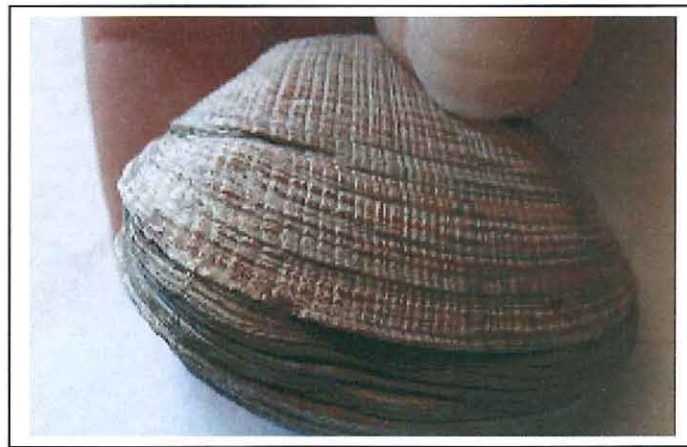
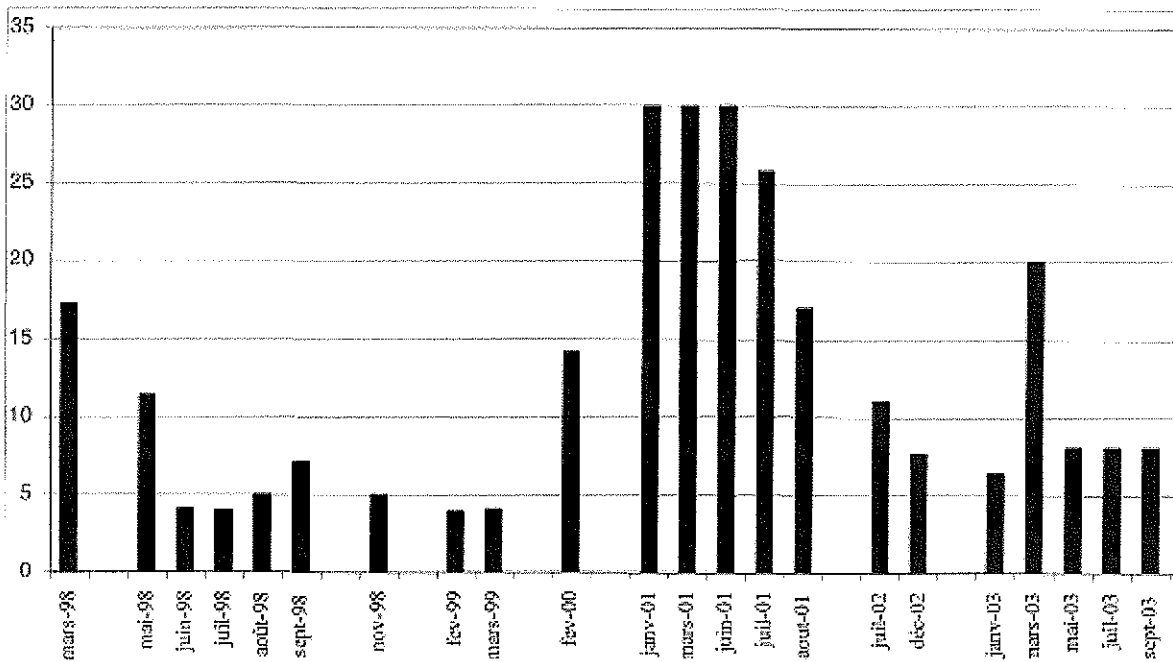


Figure 16 : Déformation de la coquille d'une palourde *Ruditapes philippinarum*, due à la présence de *Vibrio tapetis*

2-3 Comparaison à des données antérieures

La MAB se détecte préférentiellement en hiver (Février-Mars) ; cependant depuis 2001, un pic de prévalence de la MAB est observé dans le Golfe du Morbihan par Christine Paillard en automne (cf. figure 17).

Le même phénomène a été observé en 2004 (C. Paillard – Communication personnelle).



**Figure 17 : Prévalence de la MAB dans le Golfe du Morbihan en fonction des années
(Données de C. Paillard)**

Les résultats obtenus au cours de mon stage n'ont pas permis d'observer ce phénomène. Cependant, en raison de la nécessité d'optimiser la technique d'extraction, tous les échantillons n'ont pas pu être analysés, en particulier ceux du Golfe du Morbihan.

La maladie de l'anneau brun n'a pas été retrouvée dans le bassin d'Arcachon, mais le bassin est un secteur où la prévalence de la Maladie de l'anneau brun est faible (C Paillard – Communication personnelle).

Elle n'a pas non plus été observée sur les îles Chausey. Le secteur de Chausey est un cas particulier car il s'agit d'un élevage et non d'un gisement naturel. Les géniteurs sont sélectionnés sur certains caractères notamment l'absence de MAB. Ce secteur ne reflète donc pas ce qui se passe dans le milieu naturel.

CONCLUSION PERSPECTIVE

Au vue des résultats obtenus, il ressort de ce stage deux recommandations importantes pour le diagnostic de routine de la maladie de l'anneau brun :

- Il est impératif de réaliser une PCR universelle sur chaque lot à traiter avant d'effectuer la PCR spécifique *Vibrio tapetis* afin de vérifier l'intégrité de l'ADN extrait et savoir s'il est amplifiable.
- Il est préférable lors de l'extraction par la méthode Chelex 5%, de laisser les échantillons toute la nuit à 56°C et non pas 4h comme indiqué sur le protocole de Christine Paillard afin que le Chelex supprime correctement l'activité des inhibiteurs de la réaction de PCR contenus dans certains lots.

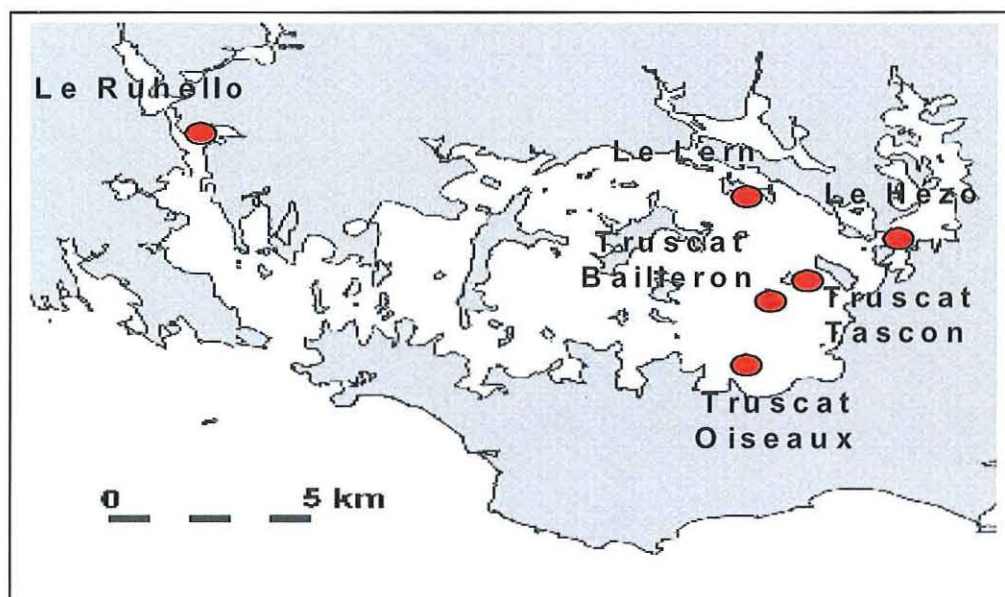
La PCR est une technique très intéressante pour diagnostiquer *V. tapetis* notamment en diagnostic de routine, car elle est rapide et facile à utiliser contrairement à la technique d'isolement et séroagglutination qui est longue et contraignante.

Il sera intéressant d'achever les analyses afin d'obtenir une image de la MAB en automne sur les principaux bassins producteurs de palourdes. Nous pourrions également savoir si nous retrouvons ce que Christine Paillard a pu observer depuis 2001 dans le Golfe du Morbihan et voir si ce phénomène se retrouve dans d'autres régions.

Pour finir, il faudra poursuivre l'échantillonnage commencé en 2004 en 2005 et voir ainsi si on retrouve la même tendance, à savoir l'absence de détection de la maladie de l'anneau brun en automne.

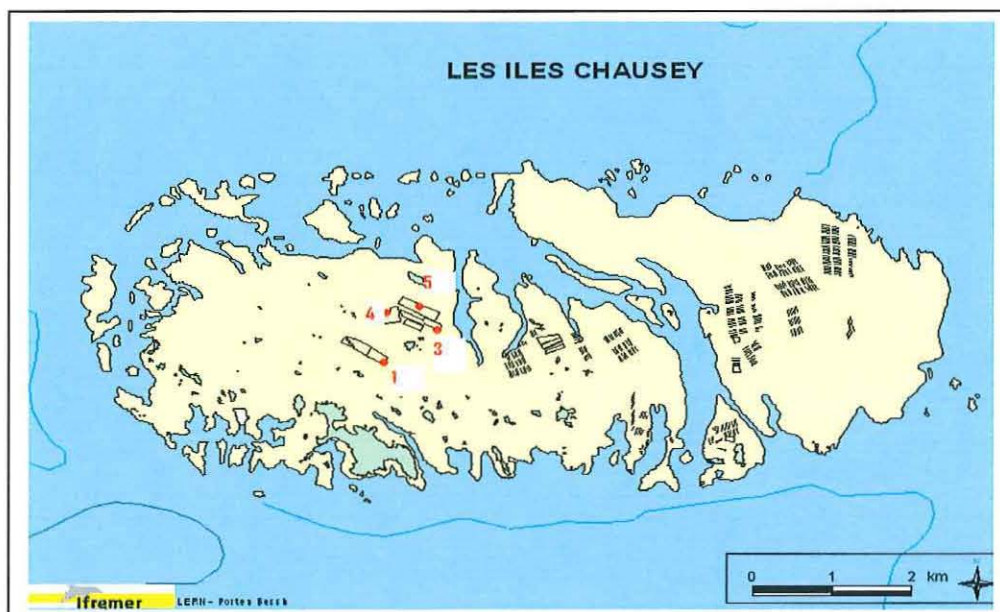
ANNEXES

ANNEXE I : Localisation des points de prélèvement



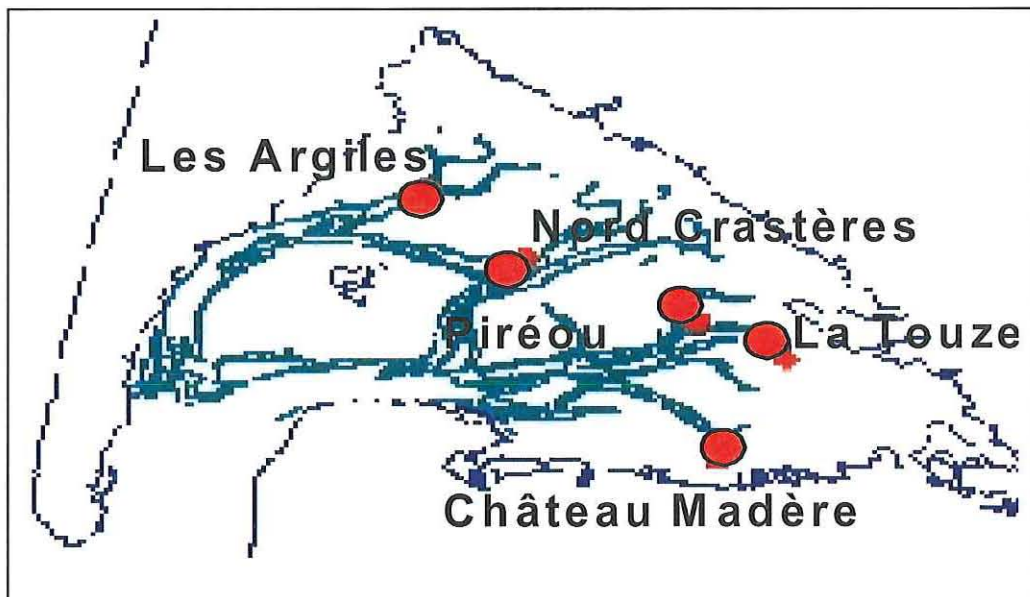
Carte du Golfe du Morbihan

- Lot 04/086 : Golfe du Morbihan – Gisement de Truscat, près de l'île Tascon
- Lot 04/072 : Golfe du Morbihan – Le Hézo
- Lot 05/011 : Golfe du Morbihan – Gisement de Truscat, près de l'île Bailleron



Carte des Iles Chausey

- Lot 04/076 : Ile Chausey – Point 3
- Lot 04/073 : Ile Chausey – Point 1



Carte du Bassin d'Arcachon

- Lot 04/097 : Bassin d'Arcachon – Les Argiles
- Lot 04/105 : Bassin d'Arcachon – La Touze

ECHANTILLONS																															
LOTS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
04/086						(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)
04/072	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)																					
05/011	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	(+)				(+)							-			
04/097	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-
04/105	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
04/076	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)
04/073	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)											
05/009	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

ECHANTILLONS										
LOTS	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
04/085										
04/086										
04/072										
04/097										
04/105										
04/076	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
04/073										
05/009										


-  Golfe du Morbihan
-  Bassin d'Arcachon
-  Iles Chausey
-  Ile d'Oléron

Tableau des résultats de la PCR universelle

ANNEXE II

ECHANTILLONS																														
LOTS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
04/086	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
04/072	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
05/011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
04/097	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
04/105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
04/076	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
04/073	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
05/009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ECHANTILLONS										
LOTS	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
04/086	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
04/072	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
05/011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
04/097	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
04/105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
04/076	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
04/073	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
05/009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-


-  Golfe du Morbihan
-  Bassin d'Arcachon
-  Iles Chausey
-  Ile d'Oléron

Tableau des résultats de la PCR *Vibrio tapetis*

ANNEXE III

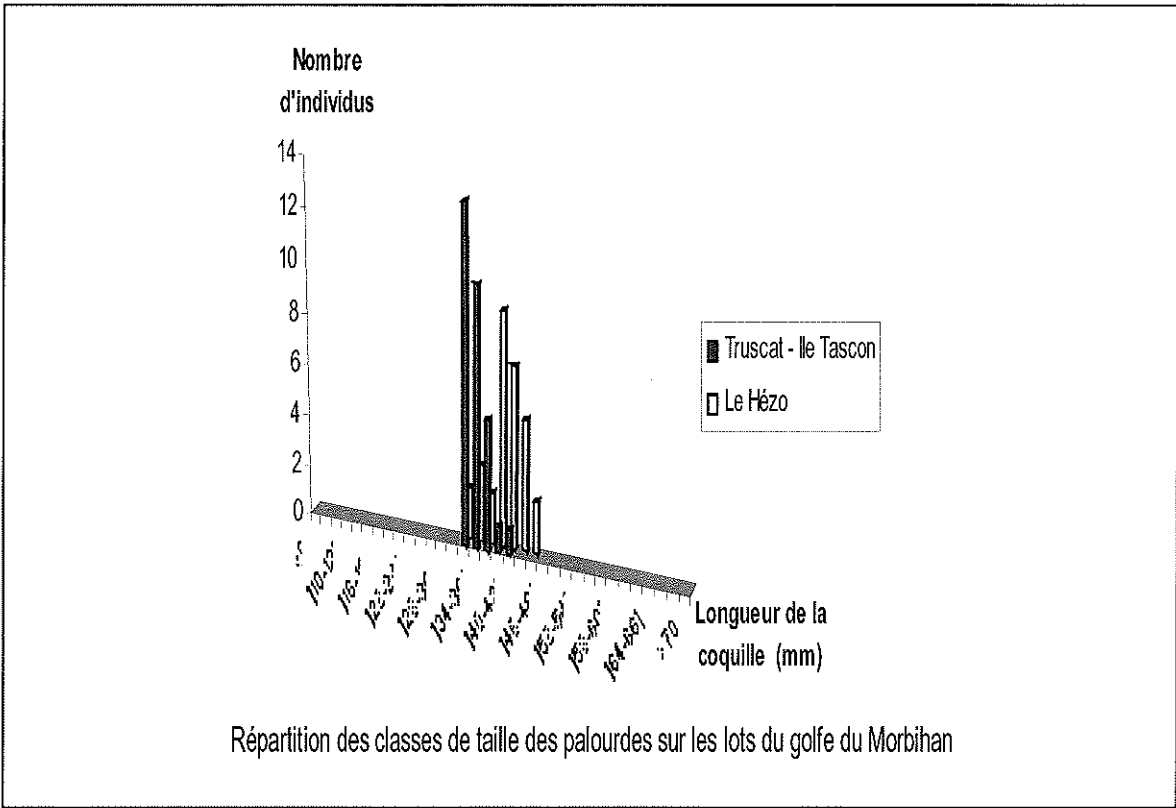
ANNEXE IV : Analyses coquillières et PCR des lots analysés

LOT N°04/086

Individu N°	Grande longueur (mm)	Anneau brun	Autres observations	PCR Universelle	PCR <i>Vibrio tapetis</i>	Classe de taille en mm	Nombres de palourdes
1	3,27	-				<6	
2	3,38	-]6-8]	
3	3,93	-]8-10]	
4	3,43	+	cicatrisé]10-12]	
5	3,39	-]12-14]	
6	3,36	-		+	-]14-16]	
7	3,54	-		-]16-18]	
8	3,37	-		+	-]18-20]	
9	3,59	-		+	-]20-22]	
10	3,51	-		+	-]22-24]	
11	3,62	-		+	-]24-26]	
12	3,3	-		+	-]26-28]	
13	3,59	-		-]28-30]	
14	3,37	-		+	-]30-32]	
15	3,25	-		+	-]32-34]	13
16	3,43	-		+	-]34-36]	10
17	3,25	-		+	-]36-38]	5
18	3,67	-		+	-]38-40]	1
19	3,44	-		+	-]40-42]	1
20	3,61	-		+	-]42-44]	
21	3,59	-		+	-]44-46]	
22	4,1	-		+	-]46-48]	
23	3,53	-		+	-]48-50]	
24	3,76	-		+	-]50-52]	
25	3,27	-		+	-]52-54]	
26	3,48	-		+	-]54-56]	
27	3,22	-		-]56-58]	
28	3,68	-		+	-]58-60]	
29	3,26	-		+	-]60-62]	
30	3,38	-		+	-]62-64]	
]64-66]	
]66-68]	
]68-70]	
						>70	

LOT N° 04/072

Individu N°	Grande longueur (mm)	Anneau brun	Autres observations	PCR Universelle	PCR <i>Vibrio tapetis</i>	Classe de taille en mm	Nombres de palourdes
1	4,22	+	cicatrisé	+	-	<6	
2	3,92	-		+	-]6-8]	
3	3,71	-		+	-]8-10]	
4	4,01	-		+	-]10-12]	
5	3,85	-		+	-]12-14]	
6	3,99	-		+	-]14-16]	
7	3,93	-		+	-]16-18]	
8	4,11	-		+	-]18-20]	
9	3,5	-		+	-]20-22]	
10	3,78	+	cicatrisé	+	-]22-24]	
11	4,21	-			-]24-26]	
12	3,36	-			-]26-28]	
13	4,09	-			-]28-30]	
14	3,5	+	cicatrisé		-]30-32]	
15	3,9	-			-]32-34]	2
16	3,23	-			-]34-36]	3
17	3,88	-			-]36-38]	2
18	4	-			-]38-40]	9
19	4,46	+	cicatrisé		-]40-42]	7
20	3,9	-			-]42-44]	5
21	4,07	-			-]44-46]	2
22	4,2	+	cicatrisé		-]46-48]	
23	4,37	-			-]48-50]	
24	4,22	-			-]50-52]	
25	4,26	-			-]52-54]	
26	4,41	-			-]54-56]	
27	3,83	-			-]56-58]	
28	3,52	-			-]58-60]	
29	4,15	-			-]60-62]	
30	4,06	-			-]62-64]	
]64-66]	
]66-68]	
]68-70]	
						>70	

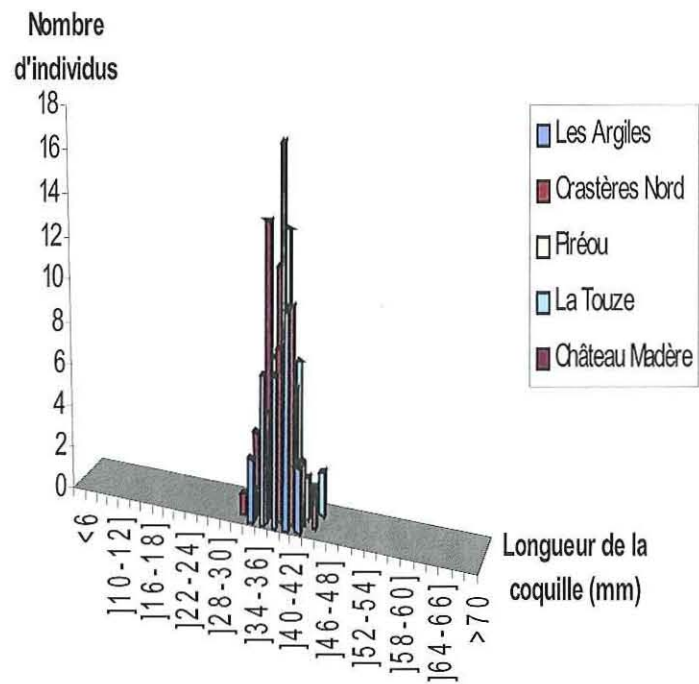


LOT N°04/097

Individu N°	Grande longueur (mm)	Anneau brun	Autres observations	PCR Universelle	PCR <i>Vibrio tapetis</i>	Classe de taille en mm	Nombres de palourdes
1	4,39	+	cicatrisé	+	-	<6	
2	3,73	-		+	-]6-8]	
3	4,14	-		+	-]8-10]	
4	4,05	-		+	-]10-12]	
5	3,65	-		+	-]12-14]	
6	4,37	-		+	-]14-16]	
7	4,08	-		+	-]16-18]	
8	3,72	-		+	-]18-20]	
9	4,31	-		+	-]20-22]	
10	3,59	-		+	-]22-24]	
11	4	+	cicatrisé	+	-]24-26]	
12	4,1	-		+	-]26-28]	
13	3,67	+	cicatrisé	+	-]28-30]	
14	3,54	-		+	-]30-32]	
15	4,2	-		+	-]32-34]	
16	3,7	+		+	-]34-36]	3
17	4,11	-		+	-]36-38]	7
18	3,93	-		+	-]38-40]	7
19	4,17	-		+	-]40-42]	10
20	3,53	-		+	-]42-44]	3
21	4,11	-		+	-]44-46]	
22	4,11	-		+	-]46-48]	
23	3,9	+	cicatrisé	+	-]48-50]	
24	3,98	-		+	-]50-52]	
25	3,63	-		+	-]52-54]	
26	3,81	-		+	-]54-56]	
27	4,05	+	cicatrisé	+	-]56-58]	
28	3,99	-		+	-]58-60]	
29	3,93	-		+	-]60-62]	
30	3,78	+	cicatrisé	-]62-64]	
]64-66]	
]66-68]	
]68-70]	
						>70	

LOT N°04/105

Individu N°	Grande longueur (mm)	Anneau brun	Autres observations	PCR Universelle	PCR <i>Vibrio tapetis</i>	Classe de taille en mm	Nombres de palourdes
1	4,1	-		+	-	<6	
2	3,85	-		+	-]6-8]	
3	3,95	-		+	-]8-10]	
4	4,11	-		+	-]10-12]	
5	4,47	-		+	-]12-14]	
6	3,87	-		-]14-16]	
7	3,91	-		+	-]16-18]	
8	4,17	-		+	-]18-20]	
9	3,81	-		+	-]20-22]	
10	3,96	-		+	-]22-24]	
11	3,84	-		+	-]24-26]	
12	4,45	-		-]26-28]	
13	3,71	-		-]28-30]	
14	3,68	-		+	-]30-32]	
15	3,58	-		+	-]32-34]	
16	3,86	-		+	-]34-36]	1
17	4,05	-		+	-]36-38]	7
18	3,93	-		+	-]38-40]	13
19	3,77	-		+	-]40-42]	7
20	3,81	-		+	-]42-44]	
21	3,77	-		+	-]44-46]	2
22	3,87	-		+	-]46-48]	
23	4,09	-		+	-]48-50]	
24	4,09	-		+	-]50-52]	
25	4,01	-		+	-]52-54]	
26	3,77	-		+	-]54-56]	
27	3,72	-		+	-]56-58]	
28	3,85	-		+	-]58-60]	
29	3,72	-		+	-]60-62]	
30	3,86	-		+	-]62-64]	
]64-66]	
]66-68]	
]68-70]	
						>70	



Répartition des classes de taille des palourdes sur les lots du bassin d'Arcachon

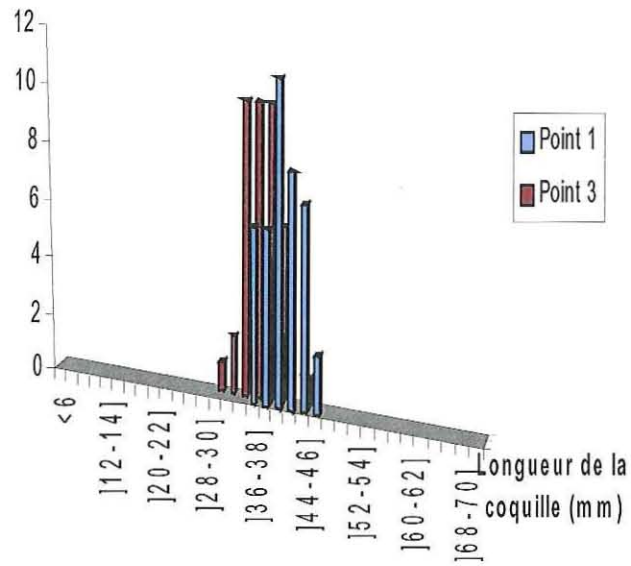
LOT N°04/076

Individu N°	Grande longueur (mm)	Anneau brun	Autres observations	PCR Universelle	PCR <i>Vibrio tapetis</i>	Classe de taille en mm	Nombres de palourdes
1	4	-		+	-	<6	
2	4,15	-		+	-]6-8]	
3	4,12	-		+	-]8-10]	
4	3,15	-		+	-]10-12]	
5	4,05	+	cicatrisé	+	-]12-14]	
6	4,01	-		+	-]14-16]	
7	3,93	-		+	-]16-18]	
8	3,72	-		+	-]18-20]	
9	4,51	-		+	-]20-22]	
10	3,97	-		+	-]22-24]	
11	3,5	+	cicatrisé	+	-]24-26]	
12	3,84	-		+	-]26-28]	
13	3,4	-		+	-]28-30]	
14	3,43	-		+	-]30-32]	1
15	3,71	+	cicatrisé	+	-]32-34]	2
16	3,76	-		+	-]34-36]	10
17	3,78	-		+	-]36-38]	10
18	3,81	+	cicatrisé	+	-]38-40]	10
19	3,97	-		+	-]40-42]	6
20	3,85	-		+	-]42-44]	
21	3,93	-		+	-]44-46]	1
22	4,08	-		+	-]46-48]	
23	3,56	-		+	-]48-50]	
24	3,8	+	cicatrisé	+	-]50-52]	
25	3,48	-		-]52-54]	
26	3,72	-		+	-]54-56]	
27	4,15	-		+	-]56-58]	
28	3,69	-		+	-]58-60]	
29	3,53	-		+	-]60-62]	
30	3,64	-		+	-]62-64]	
31	3,78	-		+	-]64-66]	
32	3,48	-		+	-]66-68]	
33	3,33	-		+	-]68-70]	
34	3,5	-		+	-	>70	
35	3,59	-		+	-		
36	3,41	-		+	-		
37	3,99	-		+	-		
38	3,91	-		+	-		
39	3,69	-		+	-		
40	3,48	-		+	-		

LOT N°04/073

Individu N°	Grande longueur (mm)	Anneau brun	Autres observations	PCR Universelle	PCR <i>Vibrio tapetis</i>	Classe de taille en mm	Nombres de palourdes
1	3,78	-		+	-	<6	
2	4,33	-		+	-	[6-8]	
3	3,91	-		+	-	[8-10]	
4	4,21	-		+	-	[10-12]	
5	4,46	-		+	-	[12-14]	
6	4,25	-		+	-	[14-16]	
7	4,75	-		+	-	[16-18]	
8	4,21	-		+	-	[18-20]	
9	4,18	-		+	-	[20-22]	
10	4,49	-		+	-	[22-24]	
11	4,39	-		+	-	[24-26]	
12	4,64	-		+	-	[26-28]	
13	4,16	-		+	-	[28-30]	
14	4,13	-		+	-	[30-32]	
15	3,89	-		+	-	[32-34]	
16	4,3	-		+	-	[34-36]	
17	4,45	-		+	-	[36-38]	6
18	4,59	-		+	-	[38-40]	6
19	4,18	-		+	-	[40-42]	11
20	3,97	-		+	-	[42-44]	8
21	4,04	-			-	[44-46]	7
22	4,2	-			-	[46-48]	2
23	4,09	-			-	[48-50]	
24	4,07	-			-	[50-52]	
25	4,51	-			-	[52-54]	
26	3,7	-			-	[54-56]	
27	4,01	-			-	[56-58]	
28	4,46	-			-	[58-60]	
29	4,08	-			-	[60-62]	
30	3,63	+	cicatrisé		-	[62-64]	
31	3,75	-			-	[64-66]	
32	3,84	-			-	[66-68]	
33	4,45	-			-	[68-70]	
34	3,87	-			-	>70	
35	3,74	-			-		
36	4,37	-			-		
37	4,35	-			-		
38	3,97	-			-		
39	3,64	-			-		
40	4,04	-			-		

Nombre
d'individus



Répartition des classes de taille des palourdes sur les îles Chausey

LOT N°05/011

Individu N°	Grande longueur (mm)	Anneau brun	Autres observations	PCR Universelle	PCR <i>Vibrio tapetis</i>
1	4,1	-		+	-
2	3,85	-		+	-
3	3,95	-		+	-
4	4,11	-		-	
5	4,47	-		+	-
6	3,87	-		+	-
7	3,91	-		+	-
8	4,17	-		+	-
9	3,81	-		+	-
10	3,96	-		+	-
11	3,84	-		+	-
12	4,45	+	cicatrisé	+	-
13	3,71	-		+	-
14	3,68	-		+	-
15	3,58	-		+	-
16	3,86	-		+	-
17	4,05	-		-	
18	3,93	-		+	-
19	3,77	-			-
20	3,81	-			-
21	3,77	+	cicatrisé	*	-
22	3,87	-			-
23	4,09	-			-
24	4,09	-			-
25	4,01	-			-
26	3,77	-			-
27	3,72	-		-	
28	3,85	-			-
29	3,72	-			-
30	3,86	-			-

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Allam B., Paillard C., Maes P. (1996). Localization of the pathogen *Vibrio* P1 in clams affected by Brown Ring Disease. *Dis Aquat. Org* 27 : 149-155.

Allam B., Paillard C. (1998). Defense factors in clam extrapallial fluids. *Dis Aquat Org* 33 : 123-113.

Allam B., Paillard C., Auffret M. (2000). Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 76 : 63-69.

Borrego JJ., Castro D., Luque A., Paillard C., Maes P., Garcia MT., Ventosa A. (1996). *Vibrio tapetis* sp. nov. the causative agent of the Brown Ring Disease affecting cultured clams. *Int. J. Syst. Bact.* 46 : 480-484.

Choquet G. (2004). Caractérisation et pathogénie des isolats de *Vibrio tapetis*, bactérie responsable de la maladie de l'anneau brun chez la palourde japonaise. Thèse de Doctorat, Université de Bretagne occidentale, 139 p.

Grizel H. (1996). Les maladies des mollusques bivalves : risques et prévention. *Rev. Sci. Tech. OIE* 16 (1) : 161-171.

Jensen S., Salmuelsen O.B., Andersen K., Torkildsen L., Lambert C., Choquet G., Paillard C et Bergh O. (2003). Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *Vibrio tapetis* isolated from corkwing wrasse *Symphodus melops* suffering vibriosis. *Dis Aquat Org* 53 : 25-31.

Maes P. (1992). Pathologie bactérienne chez deux invertébrés marins ; la maladie des lésions verte des échinides réguliers et la maladie de l'anneau brun de la palourde, *Ruditapes decussatus*. Thèse de doctorat. Brest. 204p.

Oubella R., Maes P., Allam B., Paillard C., Auffret M. (1996). Selective induction of hemocytic response in *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia) by different species of *Vibrio* (Bacteria). *Aquatic Living Ressources* 9 : 137-143.

Paillard C., Maes P. (1989). Origine pathogène de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve). *C. R. Acad. Sci. Paris, Série III* 309 : 235-241.

Paillard C., Percelay L., Le Pennec M et Le Picard D. (1989). Origine pathogène de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve). Compte rendus de l'académie des sciences 309 : 235-241

Paillard C. (1992). Etiologie et caractérisation de la maladie de l'anneau brun chez la palourde d'élevage *Ruditapes philippinarum*. Thèse de Doctorat, Université de Bretagne occidentale, 194 p.

Paillard C., Le Pennec M. (1993). Ultrastructural studies of the mantle and the periostracal lamina in the manila clam, *Ruditapes philippinarum*. Tissue and Cell 25 : 183-194.

Paillard C., Maes P., Oubella R. (1994). Brown Ring Disease in clams. Annual Review of Fish Diseases 4 : 219-240.

Paillard C., Maes P. (1995 a). The brown ring disease in manila clam *Ruditapes philippinarum*. Journal of Invertebrate Pathology 65 : 101-110.

Paillard C., Maes P. (1995 b). The brown ring disease in manila clam *Ruditapes philippinarum*. Journal of Invertebrate Pathology 6 : 91-100.

Paillard C. (2004). A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. Aquat.Living Resour. 17 : 467-475.

Paillard C., Gausson S., Nicolas J.L., Le Pennec J.P., Haras D. (2005). Molecular identification of *Vibrio tapetis*, the causative agent of the brown ring disease of *Ruditapes philippinarum*. Aquaculture (sous presse).

Reid H.I., Duncan H.L., Laidler L.A., Hunter D et Birkbeck HT. (2003). Isolation of *Vibrio tapetis* from cultivated atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) Aquaculture 221: 65-74

Saulnier D., Avarre J.C., Le Moullac G., Ansquer D., Levy P., Vonau V. (2000). Rapid and sensitive PCR detection of *Vibrio penaeicida*, the putative etiological agent of syndrome 93 in New Caledonia. Diseases of aquatic organisms, 40:109-115.