

Mortalités d'huîtres creuses adultes (*Crassostrea gigas*) et infection à *Vibrio aestuarianus* - AESTU



**Mortalités d'huîtres creuses adultes
(*Crassostrea gigas*) et infection à
Vibrio aestuarianus - AESTU**

**Rapport scientifique final de l'étude AESTU,
convention DPMA-Ifremer 2013**

sommaire

Résumé

En 2012, le nombre de cas de **mortalités d'huîtres creuses adultes** rapportés dans le cadre du réseau Repamo, et dans lesquels la bactérie *Vibrio aestuarianus* a été isolée, a fortement augmenté. Afin d'apporter de premiers éléments de réponse concernant cette augmentation, les objectifs de cette étude étaient de déterminer si l'émergence/la ré-émergence de *V. aestuarianus* était associée (i) à l'apparition d'un génotype bactérien particulier et/ou (ii) à une sensibilité accrue de certains animaux.

L'Ifremer dispose d'une collection de souches bactériennes appartenant majoritairement au genre *Vibrio* et qui comporte différents isolats de *V. aestuarianus*, collectés depuis 2001 pendant ou hors épisodes de mortalité. La comparaison de ces isolats en termes de phénotype (virulence estimée en pathologie expérimentale) et de génotype (VNTR et génomes) **n'a pas permis de mettre en évidence de génotype plus virulent particulier en 2012**, mais plutôt l'existence de 2 clades au sein de l'espèce, dont la signification reste à préciser.

Les mécanismes de virulence employés par deux souches « modèle », toutes deux hautement virulentes, ont été comparés *in vitro* et *in vivo*. Les résultats obtenus suggèrent **des mécanismes d'action divergents**, qui doivent être précisés et validés sur un plus grand nombre de souches.

Par rapport aux travaux sur l'infection à *V. aestuarianus* réalisés avant sa ré-émergence (Garnier *et al.*, 2008; Labreuche *et al.*, 2006a) de façon globale, **les animaux testés dans le cadre de cette étude se sont révélés tous très sensibles** à la bactérie, et en particulier les animaux de plus d'un an.

Les animaux de plus d'un an issus de **captage naturel ou d'écloserie, diploïdes ou triploïdes, testés au cours de cette étude présentent des sensibilités comparables** dans les conditions expérimentales choisies. Au-delà du fond génétique (lot d'animaux), de la ploïdie, de l'origine, le poids des animaux est un critère majeur influençant leur sensibilité. Enfin, la comparaison de lots issus de trois années de sélection massale (opérée sur estran pendant l'été, au moment des épisodes de mortalités associés à la détection de l'herpès virus OsHV-1) suggère une corrélation positive entre les caractères '**survie sur estran pendant la première année de vie**', '**survie face à une infection à OsHV-1**' et '**survie face à une infection à *V. aestuarianus***' pour des animaux âgés d'une année. Cependant, le nombre de lots testés dans le cadre de cette étude reste limité et un plus large panel de fonds génétiques doit maintenant être testé pour confirmer ces premières données.

Enfin, la comparaison de **l'expression de gènes** (impliqués dans différents processus dont la réponse immunitaire) dans différents lots d'huîtres a permis de discriminer des huîtres présentant **des capacités de survie différentielles** avant et à la suite d'une infection à *V. aestuarianus*. Ces résultats bien qu'ils doivent encore être validés sur de nouveaux lots pour s'assurer de leur robustesse, ouvrent des perspectives pour le développement d'outils de pronostic des capacités de survie d'huîtres et l'analyse de souches d'huîtres d'intérêt en support aux programmes de sélection.

Mots-clés - *Vibrio aestuarianus*, huître creuse, *Crassostrea gigas*, bactérie, ré-émergence, virulence, génome, statut immunitaire, génétique

Words keys - *Vibrio aestuarianus*, Pacific oyster, *Crassostrea gigas* bacteria, re-emergence, virulence, mortality, genome, immune status, genetic

Sommaire

Liste des acronymes utilisés	9
1. Introduction	11
1.1. Contexte	11
1.2. Objectifs	12
Objectif n°1 : L'émergence / la ré-émergence de <i>V. aestuarianus</i> est-elle liée à l'apparition d'un nouveau génotype ?	13
2. Matériel et méthode	15
2.1. Matériel biologique	15
2.1.1. Bactéries	15
2.1.2. Huîtres	15
2.2. Etude de la virulence bactérienne	15
2.2.1. <i>In vivo</i>	15
2.2.2. <i>In vitro</i>	16
2.3. Etude de la diversité bactérienne	17
2.3.1. VNTR et présence de gènes de virulence potentiels	17
2.3.2. Séquençage et analyse de génomes complets	20
3. Résultats	21
3.1. Comparaison de la virulence d'isolats de <i>V. aestuarianus</i> par infection expérimentale	21
3.2. Comparaison de facteurs de virulence de deux souches de <i>V. aestuarianus</i>	23
3.2.1. Comparaison d'ECPs produits <i>in vitro</i>	23
3.2.1. Souches bactériennes	24
3.3. Comparaison de la diversité génétique de souches de <i>V. aestuarianus</i> isolées en 2012 et les années précédentes, par des approches de séquençage, de gènes de virulence ou par VNTR	25
3.4. Comparaison de génomes complets de souches de <i>V. aestuarianus</i> isolées entre 2001 et 2012	27
Objectif n°2 : l'émergence / la ré-émergence de <i>V. aestuarianus</i> est-elle liée à une sensibilité accrue de certains animaux?	31
4. Matériel et Méthode	33
4.1. Matériel biologique	33
4.2. Infections expérimentales	34
4.2.1. Injection	34
4.2.2. Cohabitation	34
4.3. Recherche d'agents infectieux et suivi d'expression de gènes de l'hôte	34
4.3.1. Prélèvements	34
4.3.2. Recherche d'agents infectieux	34
4.3.3. Suivi d'expression de gènes : Extraction des ARN totaux, synthèse des ADN complémentaires et PCR quantitative	35
5. Résultats	37
5.1. Mise au point de conditions expérimentales : protocoles infectieux et âge des animaux testés	37

sommaire

5.2. Sensibilité à <i>V. aestuarianus</i> d'animaux adultes et d'origines différentes (captage naturel / éclosion) survivantes d'épisodes de mortalités en milieu naturel associés à la détection d'OsHV-1	39
5.3. Les animaux sélectionnés pour leur survie sur estran sont-ils plus résistants à différents agents pathogènes ?	40
5.4. Sensibilité d'animaux de niveaux de ploïdie différents, estimée par des cohabitations expérimentales	41
5.5. Expression génique différenciée associée au niveau de sensibilité à l'infection bactérienne ?	44
6. Discussion	49
6.1. Obj. 1. Virulence et diversité bactérienne	49
6.2. Obj. 2. Sensibilité des animaux	51
7. Conclusions générales	53
8. Références bibliographiques	55

Liste des acronymes utilisés

2n	Diploïde
3n	Triploïde
ACN	Acétonitrile
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ARN	Acide RiboNucléique
Bicam	Bicarbonate d'ammonium
DL50	Dose Létale médiane (Cet indicateur mesure la dose de substance causant la mort de 50 % d'une population animale donnée)
DO	Densité Optique
ECP	Extracellular products (Produits extracellulaires)
EDMA	Eau De Mer Artificielle
LNR	Laboratoire National de Référence (pour les maladies des mollusques bivalves marins)
PCR	Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
Rpm	Rotation par minute
TCA	Acide Trichloro-Acétique
UFC	Unité Formant Colonie
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats (nombre variable de répétition en chaîne)

1. Introduction

1.1. Contexte

Depuis 2008, les épisodes de mortalité massive (>70%) touchant le naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, sont particulièrement nombreux en France, fragilisant de nombreuses entreprises ostréicoles.

En 2012, le nombre de cas de mortalités d'huîtres creuses adultes rapportés dans le cadre du réseau Repamo (**R**éseau de **p**athologie des **m**ollusques) a fortement augmenté : seulement 11% des lots analysés en 2010 (8 lots /75) étaient positifs quant à la présence de la bactérie, contre 64% des lots analysés en 2012 (30 lots /47 lots analysés) (François *et al.*, 2013). Pour l'ensemble des lots analysés, *Vibrio aestuarianus* a été détecté systématiquement dans toutes les huîtres moribondes prélevées sur plusieurs sites alors que le virus OsHV-1 était absent ou présent en très faibles quantités. De plus, des observations en histologie ont montré la présence de lésions caractéristiques de l'infection bactérienne (recrutement et lésions hémocytaires, ruptures de jonctions cellulaires et atrophie de l'épithélium au niveau des diverticules digestives).

Vibrio aestuarianus est une bactérie marine qui a été isolée en Amérique du Nord, en Europe et en Asie où elle provoque en particulier des mortalités dans des élevages de poissons. Les souches de *V. aestuarianus* isolées d'huîtres ou de leur environnement lors d'épisodes de mortalité, montrent peu de diversité génétique (Garnier *et al.*, 2008) contrairement aux souches apparentées à *V. splendidus* (Le Roux *et al.*, 2009). Cependant, au sein de l'espèce *V. aestuarianus* ont été décrites des souches présentant un degré de virulence variable (induction de mortalités plus ou moins importantes selon les souches), suggérant que l'acquisition de gènes de virulence par transferts latéraux peut être à l'origine de la différenciation des pathotypes (Le Roux *et al.*, 2011).

Les premiers travaux portant sur les facteurs et mécanismes de virulence employés par *V. aestuarianus* ont porté sur une souche modèle, nommée 01/032 (Labreuche *et al.*, 2006a, 2006b). Cette bactérie, capable de tuer >80% des huîtres quand elle est injectée à forte concentration, sécrète des produits extracellulaires (ECPs) toxiques contenant, entre autres, une métalloprotéase zinc-dépendante de 44.4 kDa, désignée Vam (pour *V. aestuarianus* metalloprotease). Ces ECPs modifient également les capacités immunitaires des animaux et induisent, par exemple, une réduction des capacités d'adhésion et de phagocytoses des hémocytes, et une dérégulation du métabolisme oxydatif (avec la production d'espèces oxygénées réactives).

1.2. Objectifs

Afin d'apporter de premiers éléments de réponse concernant l'augmentation du nombre de cas de mortalités d'huîtres creuses adultes associés à la détection de la bactérie *Vibrio aestuarianus*, le présent travail a porté sur deux axes majeurs afin de déterminer si l'émergence / la ré-émergence de *V. aestuarianus* était liée (i) à l'apparition d'un nouveau génotype, ou/et (ii) à une sensibilité accrue des animaux de façon générale ou spécifiquement de certains animaux : de certaines origines (issus de captage ou d'écloserie), de certains niveaux de ploïdie (2n ou 3n) ou encore de certains fond génétiques (comme par exemple les animaux sélectionnés pour leur meilleure survie face à l'infection à OsHV-1).

Objectif n°1 : l'émergence / la ré-émergence de *V. aestuarianus* est-elle liée à l'apparition d'un nouveau génotype ?

La collection de souches disponible à l'Ifremer comporte différents isolats de *V. aestuarianus*, collectés depuis 2001 pendant ou hors épisodes de mortalité. La comparaison de ces isolats en termes de phénotype (virulence) et de génotype (génomes) devrait permettre de répondre à la question de l'émergence d'un (de plusieurs) nouveau(x) génotype(s).

De plus, la comparaison des données de virulence de la souche modèle 02/041, obtenues dans le cadre de cette étude ou dans les années 2006-2008, devrait apporter des éléments de réponse sur la sensibilité actuelle des animaux.

Objectif n°2 : l'émergence / la ré-émergence de *V. aestuarianus* est-elle liée à une sensibilité accrue de certains types d'animaux ?

Les lots d'huîtres moribondes analysés en 2012 dans le cadre du réseau Repamo concernent des animaux diploïdes, triploïdes, issus d'écloserie comme de captage naturel. Différents lots d'animaux ont été testés dans le cadre de l'étude afin de déterminer leur sensibilité respective. De plus, afin d'évaluer l'existence de potentielles bases génétiques (De Decker *et al.*, 2011; Fleury and Huvet, 2012) à la sensibilité/résistance aux mortalités dues à l'infection à *V. aestuarianus*, des comparaisons de la sensibilité et de la réponse immunitaire (analyse d'expression de gènes des huîtres) de différents lots d'huîtres ont été entreprises.

Dans ce contexte, l'action « AESTU » représente une première étape dans l'acquisition des connaissances relatives aux phénomènes de mortalités liées à *V. aestuarianus* observés depuis l'été 2012.

Objectif n°1 : L'émergence / la ré-émergence de *V. aestuarianus* est-elle liée à l'apparition d'un nouveau génotype ?



2. Matériel et méthode

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Bactéries

Les souches utilisées dans cette étude sont présentées dans le [Tableau 3](#). Elles sont conservées à -80°C (dans du Zobell 15% glycérol) et cultivées après décongélation en milieu Zobell gélosé ou liquide (4 g/l peptone, 1 g/l extrait de levure, 0,1 g/l citrate de fer, 0,5 g/l Tris base en eau de mer artificielle) à 22°C.

Préparation des suspensions bactériennes : des précultures de *V. aestuarianus* sont préparées par ensemencement dans 5 ml de Zobell et incubées à 22°C pendant 24 h sous agitation. Les bactéries sont ensuite lavées en eau de mer artificielle stérile et centrifugées 15 min à 20°C à 3000g. Puis, la charge bactérienne est ajustée à 10⁶ UFC/ml et à 10² UFC/ml. Enfin, la quantité de bactéries contenues dans les suspensions bactériennes est vérifiée par étalement sur milieu gélosé.

Préparation des produits extracellulaires bactériens (ECPs) : une feuille de cellophane placée sur une boîte de pétri contenant du milieu Zobell agar est inondée par 1 ml d'une pré-culture à DO₆₀₀=1 (incubée 24 h à 22°C, sous agitation). Après 48 h d'incubation à 22°C, elle est rincée par de l'eau de mer artificielle stérile afin de récupérer la phase liquide qui est par la suite centrifugée (3000 g pendant 40 min). Le surnageant contenant les ECPs est filtré à 0,22 µm et conservé à -20°C.

2.1.2. Huîtres

Pour les essais de virulence et la détermination des DL50 (Dose Létale médiane), deux lots d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, diploïdes âgées de 8-11 mois (1 à 3,5 g) (Ifremer, Argenton et Bouin, NSN 01/12 et 01/13) ont été utilisés. Ces animaux « standardisés » ont été produits à partir d'un large pool de géniteurs sauvages et conservés en milieu contrôlé pendant l'ensemble de leur parcours (eau de mer traitée aux UV).

Pour les essais *in vitro* (contact hémolymphe - produits bactériens), des huîtres de plus de 2 ans achetées chez un professionnel (Aber Benoit) ont été choisies.

2.2. Etude de la virulence bactérienne

2.2.1. *In vivo*

Après mise à sec pendant une nuit, les animaux sont « anesthésiés » dans une solution de chlorure de magnésium 50 g/l pendant 3 à 4 h. Les bactéries à différentes concentrations et les ECPs sont injectées dans le muscle adducteur. Chaque condition est testée en triplicat (3 bacs) à raison de 10 huîtres par bac. Un lot témoin est injecté avec un même volume d'eau de mer stérile. Après injection, les animaux sont

immédiatement répartis dans des bacs de 3 l d'eau de mer oxygénés à 22°C et le suivi de mortalité est effectué pendant une semaine.

2.2.2. *In vitro*

Activité azocaséinase - Un volume de 250 µl d'azocaséine (5 mg/ml Tris HCl 50mM pH8 ; 0.04% azide de sodium) est additionné par 245 µl d'eau distillée et 5 µl d'ECP (ou de tampon Tris HCl pour le blanc) et le mix est incubé 10 min à température ambiante. La réaction est arrêtée par addition de 500 µl d'acide trichlorocétique 10% (TCA) froid et centrifugation 4 minutes à 12 000g et 4°C. Le surnageant est mélangé avec une solution de NaOH 1M v/v et l'absorbance est mesurée à 440 nm. Une unité protéase est définie comme la quantité d'ECP provoquant une augmentation de l'absorbance de 0.01 unité après 10 minutes d'incubation (Labreuche et al., 2010).

Activité hémolytique - L'activité hémolytique est observée par mise en contact de 450 µl d'ECPs dans 50 µl d'une solution de tampon phosphate salin (PBS) à 3,5% de sang de cheval défibriné (Biomérieux). Après 1 h d'incubation à 30°C, les érythrocytes restants sont sédimentés par centrifugation (4000 rpm, 10 min) et l'absorbance à 405 nm de 200 µl de surnageant, synonyme de lyse, est mesurée en spectrophotométrie (Liu, 1957).

Effet des ECPs sur les hémocytes de *C. gigas* - L'hémolymphe est prélevée au niveau du muscle adducteur, à partir de dix huîtres adultes et conservée sur glace. Les mesures sont réalisées en triplicat par comptage de 10 000 évènements, avec un cytomètre en flux FACSCalibur™ (BD).

Pour les essais de phagocytose, 100 µl d'hémocytes sont incubés avec 300 µl d'ECPs 5 µg/ml (ou de tris HCl 50 mM pH 8 ou EDMA) en présence de 40 µl de billes fluorescentes (Fluoresbrite Carboxymicrosphères, 2,0 µm, Polysciences®) à 18°C pendant 2h. L'activité de phagocytose des hémocytes est mesurée par le pourcentage de cellules phagocytant 3 billes ou plus en cytométrie en flux (Delaporte et al., 2003; Gagnaire et al., 2004). Chaque échantillon est traité en triplicat.

Pour les essais d'adhérence, 100 µl de mélange ECPs/EMSA sont mélangés à 100 µl d'hémolymphe dans des micro-plaques (24 puits) et incubés à 18°C pendant 2h. Les cellules non adhérentes contenues dans le surnageant sont dénombrées en cytométrie en flux après transfert et ajout de 200 µl d'EMFS et 4 µl de SybrGreen sur glace. La capacité d'adhérence est exprimée en pourcentage d'hémocytes ayant adhéré par rapport à un contrôle mis en contact avec de l'eau de mer (Delaporte *et al.*, 2003). Chaque échantillon est traité en triplicat.

Caractérisation des ECPs par électrophorèse bidimensionnelle - Un extrait protéique est préparé suite à une précipitation des protéines selon la technique TCA/Acétone (Dubief and Nicolas, 2013). Après solubilisation dans 250 µl de tampon de réhydratation (Destreak rehydration solution, GE healthcare) contenant 1% de solution IPG buffer 3-10 (GE Healthcare), l'extrait protéique est déposé sur les bandelettes (immobiline drystrip pH 3-10, GE Healthcare) dans une solution d'hydratation (8 M urée, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0.2% d'ampholytes 3-10) pendant

12 h, puis focalisé pendant 8 h (Protean i12 IEF cell, Biorad). Avant la seconde migration (2ème dimension), le strip gel est incubé respectivement pendant 15 minutes dans une première solution d'équilibration (0.375 M Tris HCl, SDS 2%, Glycérol 20%, Urée 6M, DTT 2%), puis dans une deuxième (0.375 M Tris HCl, SDS 2%, Glycérol 20%, Urée 6 M, Iodoacétamine 25 mg/ml ajouté extemporanément). Les protéines sont par la suite séparées sur un gel d'acrylamide 10%-16% en conditions dénaturantes pendant 2 h à 200 V (Artigaud et al., 2013) et la révélation est faite par coloration au bleu de Coomassie.

Identification des protéines contenues dans les ECPs par spectrométrie de masse

Les spots de protéines observés sont excisés, lavés dans 25 µl de bicarbonate d'ammonium (bicam) 50 mM, deshydratés avec deux bains d'acétonitrile (ACN) et séchés à l'aide d'un évaporateur rotatif. Deux microlitres de solution de bicam/trypsine (0,4 µg/µl), puis 20 µl de bicam sont ajoutés avant d'incuber les tubes à 37°C pendant 12h. Le gel est ensuite déshydraté avec de l'ACN, réhydraté avec de l'acide formique (5%), puis encore déshydraté à l'ACN. A chacune de ces étapes, le surnageant contenant les peptides est récupéré. Les tubes sont ensuite évaporés (45°C sous vide) et conservés à -20°C jusqu'à analyse. Chaque tube (sec) est repris avec 13 µl d'acide trifluoroacétique (TFA)/eau (0,1%) et mis dans un bain à ultrason avant dépôt d'1 µl d'échantillon sur une plaque d'acier poli avec 1 µl d'une matrice d'acide hydroxycinnamique, HCCA dans un mélange d'ACN 60% et TFA 0,1%. Après analyse de la plaque par Maldi-TOF, les identifications sont réalisées par comparaison avec la base de donnée du laboratoire réunissant les génomes de *V. harveyi* et *V. aestuarianus* grâce au logiciel MASCOT (Hirosawa *et al.*, 1993).

2.3. Etude de la diversité bactérienne

2.3.1. VNTR et présence de gènes de virulence potentiels

Dans l'optique de distinguer les différentes souches de *V. aestuarianus* par la taille de leurs VNTR ou la présence de gènes de virulence, 12 loci microsatellites ont été ciblés (http://minisatellites.u-psud.fr/ASPSamp/base_ms/blast/blast_primers.php, à partir du génome de la souche 02/041) ainsi que neuf gènes de virulence. L'ADN des différentes souches bactériennes a été extrait selon le protocole du QIAamp DNA and Blood Mini (QIAGEN). Une amplification PCR (2 mM MgCl₂, 0,2 µM amorces R et F, 100 ng d'ADN, GoTaq® Flexi DNA Polymerase PROMEGA) a été réalisée avec chaque couple d'amorces ([Tableau 1](#), [Tableau 2](#)) : 94°C 5 min, puis 20 cycles (94°C 1 min, 57°C 1 min, 72°C 2 min) avant une élongation finale à 72°C de 10 min. Les produits PCR ont été analysés sur gel d'agarose 2% et grâce au Geldoc XR, BIORAD.

Tableau 1 : Liste des amorces utilisées pour l'analyse des VNTR

VNTR	Nom des amorces	Séquence (5'-3')	Taille attendue (pb)	Longueur du VNTR (pb)	Nbr de répétitions (pb)
181	VaVNTR181-1F	TTCAGTCGATTGTCCAGACG	385	126	1.96
	VaVNTR181-1R	CACCATGATGTCACCACCAC			
259	VaVNTR259-1F	CGACCTGTTGAAGGAACCTC	322	20	2.75
	VaVNTR259-1R	AAGGGACCGATGTAGACCAA			
474	VaVNTR474-1F	GCTGATCGCCATAATCAGTG	235	27	2
	VaVNTR474-1R	CAGAACGGCACTTCAGAACA			
619	VaVNTR619-1F	TTTACGTGACGCCGAAGG	689	166	3.6
	VaVNTR619-1R	GAGCGAGTTTGCTATGATGC			
981	VaVNTR981-1F	TTACCGGTTTCGTAGCGTTCC	220	21	2.47
	VaVNTR981-1R	TCTAATGAGTTGACCGAGTATTGG			
2126	VaVNTR2126-1F	GCGGTCGATATGCTGTAATG	164	17	3.41
	VaVNTR2126-1R	GCTCACTTAAGCCCTTCAG			
1555	VaVNTR1555-1F	GAGCAAACAGGTTTCACAGACA	300	102	1.8
	VaVNTR1555-1R	CACTCGGACGCACCATTT			
330	VaVNTR330-1F	CGCCGCTAGTTAATTTGGTC	214	19	2.84
	VaVNTR330-1R	CGGCTTAGAAGGGTCACATC			
426	VaVNTR426-1F	AGCCACAATTTAAGGCAACG	192	29	1.89
	VaVNTR426-1R	TTGCCTCACCCAATCTGAC			
508	VaVNTR508-1F	ATTGCGTCGACAATGTGTGT	233	27	1.9
	VaVNTR508-1R	GCGACGTAGTCGCTGGTTA			
508	VaVNTR508-2F	TTGGGATTAAGTTGCCAAA	214	27	1.9
	VaVNTR508-2R	GCAGCAACTCAATGATCAGG			
1809	VaVNTR1809-1F	CTTCATCACCTTCACGAGCA	278	45	1.9
	VaVNTR1809-1R	CGTCGCTCTCGTTGTATTGT			
3087	VaVNTR3087-1F	CTTGCCCGAGCATTGATAAC	238	19	3
	VaVNTR3087-1R	TGAGGCGCAGTTAGAGTTGA			
403	VaVNTR403-1F	GCAAAGTGGGCAAAGCAA	249	91	2
	VaVNTR403-1R	CGGCACCAGTTCTATATCATC			

Tableau 2 : Liste des amorces utilisées pour l'analyse des facteurs de virulence

Gènes de virulence	Nom des amorces	Séquence (5'-3')	Taille attendue (pb)
VIBAEv2_A40074 Colicin V	Va-A40074-1F	CGCGCCAACCTTAAGATGTAA	594
	Va-A40074-1R	GGTTTACAGGCGTTGTACCC	
VIBAEv2_A100018 Hémolysin	Va-A100018-1F	CCACATTGATGCGAAAGTTG	821
	Va-A100018-1R	TCTAGGGCTGGTCAGCAAGT	
VIBAEv2_A140009 Toxine	Va-A140009-1F	TCGCCGACTTAACCTACAAA	385
	Va-A140009-1R	TGGCTCTACTCTGCAACAACA	
VIBAEv2_A140010 anti-toxin of the RelB	Va-A140010-1F	TGTTGCAGAGTAGAGCCAAGC	368
	Va-A140010-1R	ATACCGCTTGTTGAGGCTA	
VIBAEv2_A140018 Toxine	Va-A140018-1F	CGGCGTTAGTTGCCTTATCA	387
	Va-A140018-1R	CGTCATCAGTCCACGACAGT	
VIBAEv2_A140019 Toxin of the YoeB-YefM	Va-A140019-1F	CCGTTTCGATAGCACAGTACC	349
	Va-A140019-1R	TTAGATGCCAGATCGCTGAG	
VIBAEv2_B10066 Exported hemolysin	Va-B10066-1F	GTAAATACGGCCAGCATAACG	343
	Va-B10066-1R	TATCACTACGCCACCCATTG	
VIBAEv2_B20359 Hémolysine	Va-B20359-1F	GAAATCAAAGTTAGAGGGTGAACAA	676
	Va-B20359-1R	CACGCTGCATTAAGGTTTCA	
VIBAEv2_B20434 Thermolabile hemolysin	Va-B20434-1F	GAGCGGCTGTGGATGTATTT	1389
	Va-B20434-1R	TCATTGACTGATTGCTATGTGAGA	
VIBAEv2_B20436 lipase	Va-B20436-1F	CACCCTATACAAAGAAGGAACATCT	1000
	Va-B20436-1R	CCAAATAGCGCAGGCTTT	

2.3.2. Séquençage et analyse de génomes complets

Séquençage de génomes, assemblage et annotation

Le génome complet de la souche *V. aestuarianus* 02/041 a été (i) obtenu par un séquençage Sanger avec une couverture de 4X, (ii) complété par un séquençage 454 avec une couverture de 16X et (iii) finalement assemblé par des PCRs. L'assemblage *de novo* a été réalisé avec les programmes Newbler et Velvet.

Les 13 autres souches de *V. aestuarianus* (Tableau 3) ont été séquencées en utilisant la technologie Illumina HiSeq2000 avec une couverture d'environ 50X. L'assemblage de ces 13 souches a été réalisé en utilisant la suite CLCbio (QIAGEN) et en combinant un assemblage *de novo* avec un assemblage sur référence (02/041). Les annotations syntaxiques (prédiction des régions codantes) et les annotations fonctionnelles ont été réalisées par la plateforme MicroScope (Vallenet *et al.*, 2009).

Analyses *in silico*

Une base de données dédiée a été créée afin de stocker les résultats Blast et ainsi pouvoir réaliser des analyses en génomique comparative et en phylogénie. Les protéines orthologues ont été définies par best-hit réciproque avec 80 % comme seuil de couverture maximale, et 30 % ou 60 % comme seuils d'identité pour les analyses intra- ou inter-espèces (Daubin *et al.*, 2002).

Les alignements de séquences nucléiques ont été générés par le programme Muscle (Edgar, 2004) et filtrés par Gblocks (Castresana, 2000). Les arbres phylogénétiques ont été construits avec PhyML en appliquant l'algorithme du Maximum-Likelihood, le modèle GTR et 100 répliquats comme bootstrap (Guindon, 2010). L'analyse des topologies d'arbres obtenues s'est faite en utilisant la librairie python ETE2 (Huerta-Cepas *et al.*, 2010).

3. Résultats

Afin d'évaluer l'émergence d'un génotype très virulent de *V. aestuarianus* affectant les huîtres creuses, la virulence de souches bactériennes isolées en 2012 a été comparée à celle d'une souche référence décrite depuis 2002, par des essais de pathologie expérimentale (3.1) et via l'étude *in vitro* et *in vivo* de l'effet de facteurs de virulence potentiels (3.2). De plus, la diversité de ces souches a été estimée par l'étude de régions génomiques ciblées (3.3), mais également par la réalisation et la comparaison de génomes complets (3.4).

3.1. Comparaison de la virulence d'isolats de *V. aestuarianus* par infection expérimentale.

Neuf souches collectées en 2011-2012 et six souches isolées entre 2001 et 2007, issues des collections du LNR (LGPM, La Tremblade) et du LPI de Brest, ont été comparées lors d'infections expérimentales. Les mortalités observées permettent de définir trois grandes classes de souches : **1/** celles induisant de **fortes mortalités à des doses très faibles** (sept souches, HV : Hautement Virulentes, DL50 <10² bactéries/animal), **2/** celles induisant de **fortes mortalités à des doses fortes uniquement** (trois souches, MV : Moyennement Virulentes, DL50 comprises entre 10⁶ et 10⁷ bactéries/animal) et **3/** celles n'induisant que **peu de mortalités** quelles que soient les doses utilisées (quatre souches, FV : Faiblement Virulentes, DL50 > 10⁷ bactéries/animal) ([Tableau 3](#)).

De premières expériences de balnéation visant à comparer la souche 12/016 (isolée en 2012) avec la souche 02/041 (isolée en 2002) ont permis d'observer l'induction de mortalités comparables (60% de mortalités huit jours après contamination de l'eau de mer). Néanmoins le manque de reproductibilité de ces expériences de balnéation, certainement lié aux variations de l'état physiologique des animaux n'a pas permis de reproduire ces expériences sur l'ensemble des souches.

Dans les conditions expérimentales testées, en comparaison avec la souche 02/041 faisant référence, les différentes souches virulentes isolées en 2012 présentent des **DL50 du même ordre de grandeur** (DL50 <10² bactéries injectées/animal). Il est important de souligner que la DL50 de souches virulentes de *V. aestuarianus*, ainsi que celle des souches virulentes de *V. splendidus*, était définie jusqu'en 2007 à 10⁷ bactéries injectées/animal (Garnier *et al.*, 2007; Nicolas, comm. pers.). Lors des expériences effectuées en 2012-2013 - avec les mêmes souches bactériennes - il a été observé que cette DL50 était 10 000 fois plus faible pour *V. aestuarianus* uniquement. Toutefois, il est important de noter que la comparaison d'expériences réalisées à plusieurs années d'intervalle et sur des animaux différents, peut présenter des biais.

En conclusion, il n'a pas été mis en évidence de virulence accrue des souches isolées récemment. Par contre une sensibilité accrue des huîtres à l'injection de souches virulentes *V. aestuarianus* est suspectée suite à ces premiers résultats.

Tableau 3: Liste des souches utilisées dans cette étude. L'origine géographique des souches, le contexte dans lequel elles ont été isolées, ainsi que les mortalités qu'elles induisent *in vivo* chez l'huître *Crassostrea gigas* sont indiqués. Les trois classes de souches proposées sont indiquées par le code couleur suivant : rouge = souches hautement virulentes, orange = souches moyennement virulentes et vert = souches non virulentes.

Souche	Origine	Mortalités d'huîtres au moment de l'isolement	Mortalités (%) induites suite à l'injection de :		DL 50 (6 jours post-infection)	Statut
			10 ⁷ UFC /animal	10 ² UFC /animal		
01_032	Huître creuse, septembre 2001, Argenton, Bretagne, France	oui	95	0	[1 ^{E6} – 1 ^{E7}]	MV
01_151	Huître creuse, juillet 2001, La Trinité, Bretagne, France	oui	3	0	>1 ^{E7}	FV
01_308	Huître creuse, août 2001, Normandie, France	oui	93	10	[1 ^{E6} – 1 ^{E7}]	MV
02_041	Huître creuse, 2002, Argenton, Bretagne, France	oui	95	78	<1 ^{E2}	HV
12_016a	Huître creuse, mars 2012, La Tremblade, Charente Maritime, France	oui	85	90	<1 ^{E2}	HV
12_055	Huître creuse, juin 2012, Agnas, Charente Maritime, France	oui	97	87	<1 ^{E2}	HV
12_063	Huître creuse, septembre 2012, Brest, Bretagne, France	oui	100	87	<1 ^{E2}	HV
12_128a	Huître creuse, septembre 2012, Bretagne, France	oui	100	97	<1 ^{E2}	HV
12_130	Huître creuse, septembre 2012, Agnas, Charente Maritime, France	oui	100	100	<1 ^{E2}	HV
12_142	Huître creuse, octobre 2012, Normandie, France	oui	100	93	<1 ^{E2}	HV
07_115	Huître creuse, 2007, Bretagne, France	non	95	13	[1 ^{E6} – 1 ^{E7}]	MV
11_KB19	Huître creuse, mars 2011, Fangar Bay, Espagne	non	17	0	>1 ^{E7}	FV
11_U17	Zooplancton, mai 2011, Goro lagoon, Italie	non	30	0	>1 ^{E7}	FV
12_122	Coque <i>C. edule</i> , août 2012, Bretagne, France	non	40	3	>1 ^{E7}	FV

Cette étude a également permis de mieux définir les conditions expérimentales permettant de comparer le niveau de virulence de souches de *V. aestuarianus*. Ainsi, par des protocoles basés sur l'analyse de l'effet induit par l'injection de différentes doses de bactéries, **les souches isolées lors d'épisodes de mortalités d'huîtres en 2012 ont toutes été classées comme hautement virulentes (6 souches / 6 testées).**

Ces observations amènent à s'interroger sur l'évolution de la proportion de souches hautement virulentes présentes dans l'environnement et dans les animaux. Des données pourront être acquises par une étude de plus grande ampleur s'appuyant sur la large collection de souches de l'Ifremer (LNR/LGPMM La Tremblade, collection de plus de 200 souches de *V. aestuarianus* collectées depuis 2006; LPI, collection depuis 2001) ainsi que sur de nouveaux échantillonnages permettant l'isolement de souches environnementales (projet ANR Opopop, 2014-2018).

3.2. Comparaison de facteurs de virulence de deux souches de *V. aestuarianus*.

3.2.1. Comparaison d'ECPs produits *in vitro*

Contrairement aux produits extracellulaires (ou ECPs) produits par la souche 02/041, les ECPs sécrétés par la souche 12/016 ne présentent pas d'activité protéasique *in vitro*, mais une activité hémolytique. Les ECPs produits par la souche 02/041, uniquement, induisent également une inhibition *in vitro* de capacités des cellules immunitaires de l'huître (adhérence et phagocytose) ([Tableau 4](#)). De plus, l'injection dans le muscle adducteur des huîtres des ECPs de la souche 02/041 à de faibles doses provoque leur mort tandis que l'injection de ceux de la souche 12/016 n'induit aucun effet apparent ([Tableau 4](#)).

Tableau 4: Propriétés des produits extracellulaires (ECP) des souches de *V. aestuarianus* 02/041 (souche hautement virulente de référence) et 12/016 (souche hautement virulente isolée en 2012). L'activité hémolytique, protéasique (azocaséinase), ainsi que les propriétés inhibitrices et toxiques des ECPs ont été mesurées.

ECPs	02/041	12/016
Inhibition de la phagocytose <i>in vitro</i>	++	-
Inhibition de l'adhérence <i>in vitro</i>	+	-
Activité hémolytique <i>in vitro</i>	-	++
Activité protéasique (azocaséinase) <i>in vitro</i>	+++	-
Effet létal chez l'huître suite à l'injection de 20 µg/g d'ECPs	++	-

Les gels 2D de ces ECPs confirment la différence de composition suggérée par les activités enzymatiques mesurées *in vitro* (Figure 1). Dans les ECPs de la souche 02/041, la métalloprotéase Vam est très dominante (spots 1 à 5 et 7 à 9), tandis que chez ceux de 12/016 des nucléases (spots 10, 20 et 21) et une protéine membranaire (spot 11) constituent les protéines majoritaires identifiées par Maldi-Tof-Tof à partir des spots excisés. De nombreuses autres protéines membranaires ont été identifiées dans les ECPs de cette souche.

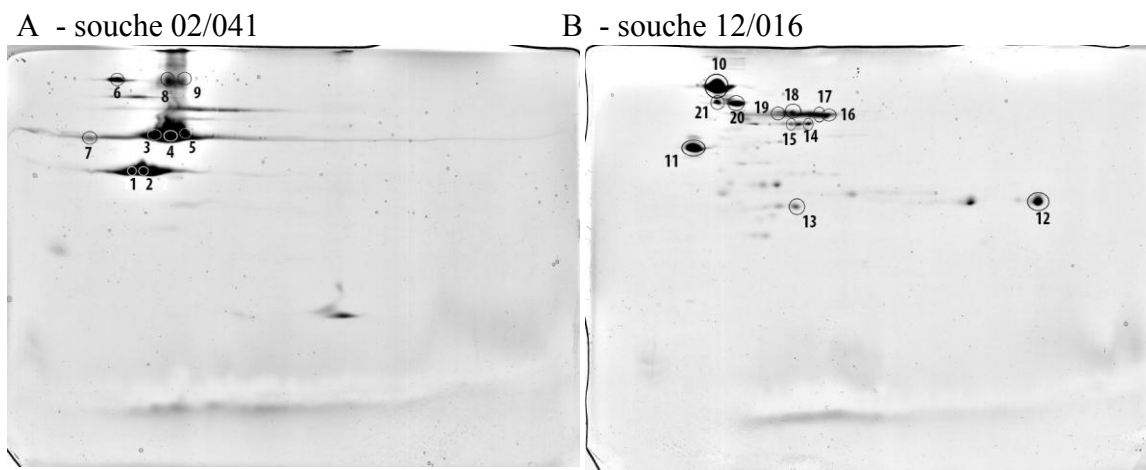


Figure 1: (A) Gel 2D des ECP 02/041. Huit spots (sur les neuf analysés) correspondent à la métalloprotéase Vam (gi 78125892). (B) Gel 2D des ECPs produits par la souche 12/016. Les spots les plus marqués correspondent à des endonucléases et à une protéine qui permet notamment l'adhésion des bactéries (OmpU).

3.2.1. Souches bactériennes

Des infections expérimentales effectuées chez des huîtres de trois ans avec les deux souches (02/041 et 12/016) en injectant 10^5 bactéries/ individu ont entraîné une très forte mortalité (100% après huit jours), malgré l'absence de toxicité des ECPs de la souche 12/016.

Suite à l'injection de la souche 02/041, les mesures d'activité protéasique et hémolytique de l'hémolymphe effectuées au cours du temps (24, 48, 72h) n'ont révélé qu'une légère activité protéasique à 24h, contrairement à ce qui était obtenu précédemment avec la même souche (Labreuche *et al.*, 2006a; Labreuche *et al.*, 2006b). Cet effet léthal était alors attribué à l'action de la métalloprotéase Vam, sécrétée *in vitro* et *in vivo* par la souche 02/041 (Labreuche, 2006). De façon similaire, *in vivo*, seule une très faible activité protéasique a pu être observée dans l'hémolymphe d'animaux infectés avec la souche 12/016.

Enfin, la mesure de paramètres hématocytaires chez ces animaux infectés par les deux souches de *V. aestuarianus* suggère des mécanismes d'action différents : pour les animaux infectés par la souche 12/016, la phagocytose de billes fluorescente par les hémocytes d'huître creuse est fortement inhibée 72 heures après l'injection alors qu'elle reste très élevée suite à l'injection de la souche 02/041 (Figure 2).

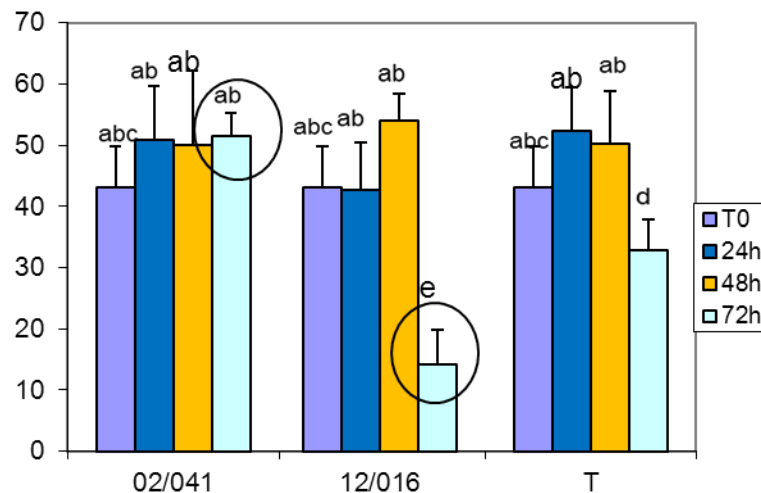


Figure 2 : Mesure de la phagocytose des hémocytes des huîtres infectées par *V. aestuarianus* (souche 02/041, 12/016) ou témoin (T = témoin eau de mer) au cours du temps (t0, t = 24 h, t = 48 h, t = 72 h).

En conclusion, les souches de *V. aestuarianus* 12/016 et 02/041, toutes deux classées hautement virulentes, sont différentes (i) dans la composition des protéines qu'elles excrètent *in vitro*, et (ii) dans l'effet que ces bactéries induisent chez l'huître. Ces résultats suggèrent l'implication de facteurs autres que la métalloprotéase précédemment décrite dans la virulence de *V. aestuarianus* et doivent être confirmés en analysant un plus grand nombre de souches.

3.3. Comparaison de la diversité génétique de souches de *V. aestuarianus* isolées en 2012 et les années précédentes, par des approches de séquençage, de gènes de virulence ou par VNTR

Une comparaison de souches, isolées de sédiment, de zooplancton, de coques, d'huîtres vivantes ou moribondes, entre 2001 et 2007 et à partir de 2012, a été réalisée. Le dendrogramme construit à partir de la matrice de distance déterminée par la présence /absence d'amplification de gènes (ou de taille de VNTR) indique qu'il y a une certaine diversité de souches et que les souches isolées depuis 2012 se répartissent dans les mêmes groupes que ceux des souches isolées précédemment (Figure 3). Par ailleurs, ces groupes ne discriminent pas les souches virulentes des non virulentes même si la plupart des souches virulentes sont trouvées dans les groupes 1 et 2. Il est à noter également que cette méthode ne permet pas de distinguer les souches environnementales de celles isolées d'huîtres moribondes puisqu'elles sont toutes par exemple dans le groupe 2.

En conclusion l'hypothèse d'une émergence depuis 2012 d'un génotype particulier n'est pas vérifiée. De plus, l'acquisition de nouveaux facteurs de virulence dans un aussi grand nombre de génotypes apparaît très peu probable.

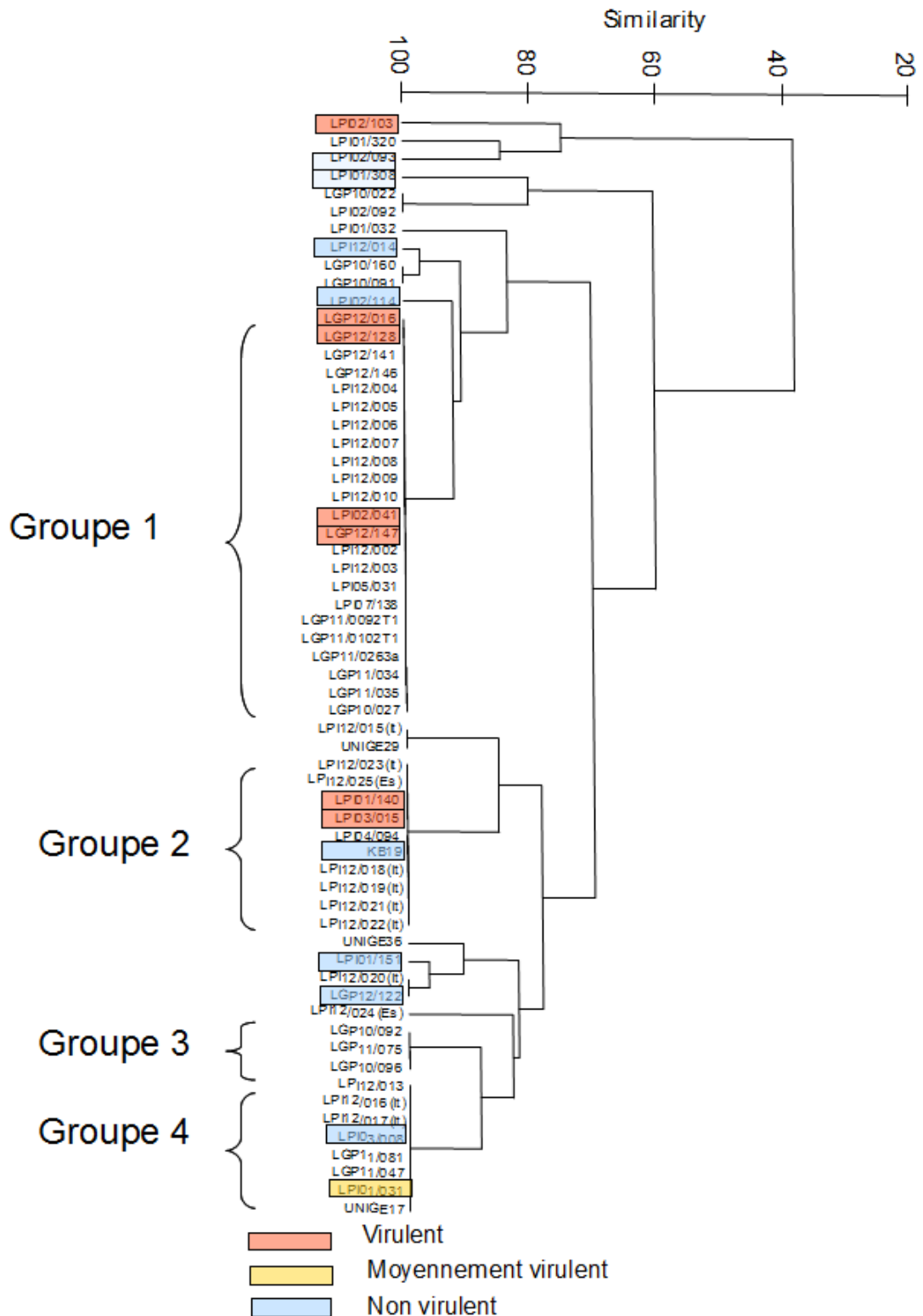


Figure 3 : Dendrogramme construit à partir de la matrice de distance. Il regroupe les souches en fonction des gènes de virulence et des VNTR qu'ils possèdent ou non. L'année d'isolement est indiquée par le premier chiffre de la numérotation des souches : par exemple LGP 12/016 a été isolée en 2012.

3.4. Comparaison de génomes complets de souches de *V. aestuarianus* isolées entre 2001 et 2012

Un premier génome (souche de *V. aestuarianus* hautement virulente isolée en 2002) a été séquencé au Génoscope (appel d'offre 2007) et a constitué une base pour la présente étude (Goudenège, Travers *et al.*, en prép). Treize autres génomes de souches de *V. aestuarianus* isolées différentes années et présentant des niveaux de virulence contrastés ([Tableau 3](#)) ont été ici séquencés (séquençage illumina HiSeq « paired-end » 150 bp, réalisé par la plateforme PF1 de l'Institut Pasteur) ([Tableau 5](#)).

Tableau 5: Génomes complets séquencés. Le nombre de contigs obtenus, la taille complète du génome, le nombre de séquences codantes (CDS) ainsi que la composition en GC% des génomes sont indiqués.

Souche	Origine	Contexte de mortalité d'huîtres	Nb contigs	Taille (Mb)	Nb CDSs	GC %
01_032	Huître, septembre 2001, Argenton, Bretagne, France	Oui	327	4.02	3957	42.3
01_151	Huître, juillet 2001, La Trinité, Bretagne, France	Oui	393	4.17	4086	42.59
01_308	Huître, août 2001, Normandie, France	oui	784	4.30	4463	42.38
02_041	Huître, 2002, Argenton, Bretagne, France	oui	8	4.20	4068	42.64
12_016a	Huître, mars 2012, La Tremblade, Charente Maritime, France	oui	597	4.17	4253	42.58
12_055	Huître, juin 2012, Agnas, Charente Maritime, France	oui	577	4.17	4238	42.57
12_063	Huître, septembre 2012, Brest, Bretagne, France	oui	983	4.51	4717	42.37
12_128a	Huître, septembre 2012, Bretagne, France	oui	1201	4.44	4806	42.45
12_130	Huître, septembre 2012, Agnas, Charente Maritime, France	oui	1310	4.52	4924	42.48
12_142	Huître, octobre 2012, Normandie, France	oui	731	4.35	4477	42.38
07_115	Huître, 2007, Bretagne, France	non	402	4.08	4067	42.64
11_KB19	Huître, mars 2011, Fangar Bay, Espagne	non	1546	4.87	5355	42.52
11_U17	Zooplancton, mai 2011, Goro lagoon, Italie	non	725	4.41	4451	42.52
12_122	Coque <i>C. edule</i> , août 2012, Bretagne, France	non	986	4.82	4949	42.29

Après sélection de 100 gènes du core-génome au hasard (trois jeux de données distincts), alignements de séquences concaténées et analyse phylogénétique, il a pu être montré l'existence au sein de *V. aestuarianus* de deux lignées contenant chacune des souches pathogènes (Figure 4). **Aucune corrélation entre la structure génétique, et la virulence ou les dates d'isolement n'a pu être observée.** En effet, une première lignée contient les souches 01/308 et 12/063 isolées respectivement en 2001 et 2012, alors que la deuxième lignée contient quatre souches isolées entre 2001 et 2007, ainsi que cinq souches isolées en 2012. Cependant, le faible nombre de souches ne permet pas de conclure de manière non équivoque.

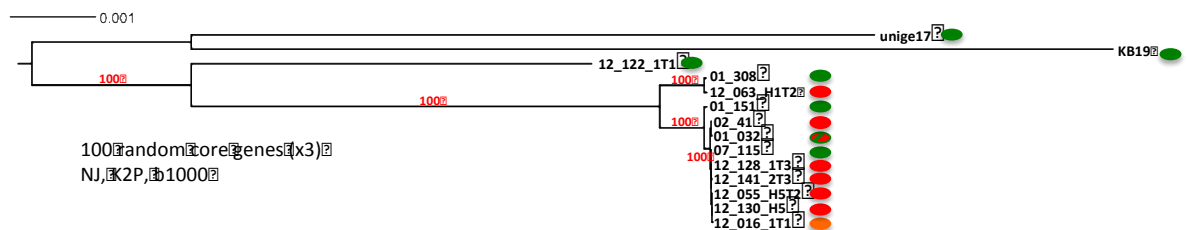


Figure 4 : Phylogénie des souches de *V. aestuarianus* basée sur les séquences de 100 gènes tirés au sort (analyse Neighbor-Joining, Bootstrap indiqués en rouge). La virulence des souches est indiquées par des pastilles (pastille verte non/peu virulente ; rouge hautement virulente ; rayée : moyennement virulente).

Trois souches (unige17, KB19 et 12_122_1T1) non virulentes pour l'huître creuse et plus éloignées phylogénétiquement ont été par la suite exclues de l'analyse ciblant uniquement les souches pathogènes pour *C. gigas*. Sur les onze souches sélectionnées, l'existence de ces deux lignées a été confirmée par l'analyse phylogénétique de 500 gènes (Figure 5).

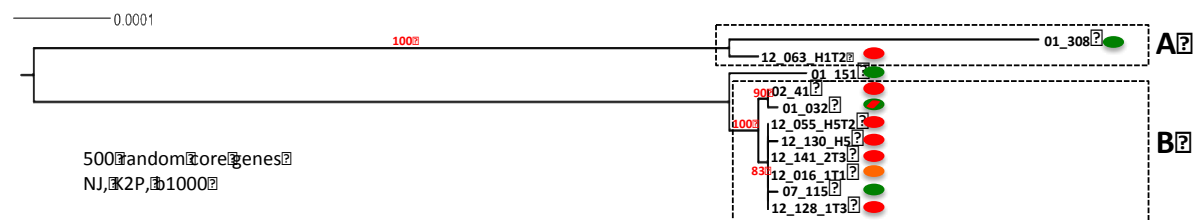


Figure 5 : Phylogénie des 11 souches de *V. aestuarianus* sélectionnées basée sur les séquences de 500 gènes tirés au sort (analyse Neighbor-Joining, Bootstrap indiqués en rouge). La virulence des souches est indiquées par des pastilles (Pastille verte non/peu virulente ; rouge hautement virulente ; rayée : moyennement virulente). Les 2 lignées (A et B) sont indiquées.

En conclusion, l'analyse des génomes de 14 souches de *V. aestuarianus* a permis de mettre en évidence deux lignées au sein de l'espèce, sans corrélation avec l'année d'isolement ni avec le niveau de virulence des souches. L'existence de ces lignées à l'aide de nouveaux marqueurs discriminants doit être confirmée sur l'ensemble de la collection de souches de *V. aestuarianus* disponible (LPI/LNR-LGPM).

Une autre perspective de ce travail sera d'identifier par génomique comparative et fonctionnelle les gènes de virulence clés communs et spécifiques à chaque lignée. Des analyses d'évolution moléculaire et d'écologie permettront également d'explorer l'origine et les conséquences de la différenciation de ces lignées (projet ANR Opopop).

Objectif n°2 : l'émergence / la ré-émergence de *V. aestuarianus* est-elle liée à une sensibilité accrue de certains animaux?



4. Matériel et Méthode

4.1. Matériel biologique

Quatre lots d'huîtres creuses diploïdes ont été testés vis-à-vis de l'infection à *V. aestuarianus* en conditions de laboratoire. Les quatre lots ont été produits en mars 2012 au LGPMM (Ifremer, La Tremblade), et n'ont pas connu d'épisodes de mortalité au cours de leur vie. Les quatre lots sont issus de deux populations, nommées A et B, ayant pour origine le bassin de Marennes-Oléron, lesquelles ont été échantillonnées en décembre 2008. Une sélection massale pour la survie sur estran au stade naissain a été réalisée chaque année de 2009 à 2011, et un lot témoin a été produit en parallèle pour contrôler la réponse à la sélection. Les lots testés dans le cadre de l'étude AESTU sont donc pour chaque population, un lot témoin (i.e., non sélectionné et ensuite nommé T) et un lot sélectionné de 3^{ème} génération pour la survie sur estran (ensuite nommé R), dont un critère majeur de sélection apparaît comme une résistance accrue à l'infection à OsHV-1. Les lots ont été respectivement nommés Pop A – T et Pop B – T pour les témoins, et Pop A – R et Pop B – R pour les lots sélectionnés pour leur survie sur estran. Lors des testages, les animaux étaient âgés d'une année pour un poids individuel moyen d'environ 20 g. Quatre groupes d'huîtres adultes *C. gigas* ont également été testés pendant l'étude en mai 2013 : un lot diploïde issu de captage naturel (poids moyen 55 g) = groupe 2n captage, un lot d'écloserie diploïde (60 g) = groupe 2n éclo, un lot triploïde d'écloserie (83 g) = groupe 3n éclo, et un lot diploïde sélectionné produit par le LGPMM (53 g) = groupe 2nR éclo. Les lots ont tous été produits en 2010, et ils ont été suivis dans le cadre du premier plan de sauvegarde de 2011 à 2013.

Les lots triploïdes utilisés dans cette étude ont été produits le 12 mars 2012 au LGPMM (Ifremer, La Tremblade), et n'ont pas connu d'épisodes de mortalité durant leur parcours d'élevage. Les différents triploïdes sont issus de croisements naturels entre des femelles diploïdes, sauvages ou issues d'écloserie, et de mâles tétraploïdes produits au sein du au LGPMM (Ifremer, La Tremblade). Trois types de géniteurs tétraploïdes ont été utilisés pour produire les différents triploïdes (4nTS, 4nR55 ou 4nChall). Les femelles diploïdes sont quant à elles issues de deux lots d'huîtres sauvages échantillonnées dans le bassin de Marennes Oléron (2nX et 2nSan) et d'un troisième lot d'huîtres diploïde sélectionné produit par le LGPMM (2nR). Les mâles tétraploïdes utilisés dans cette étude sont exclusivement destinés à des programmes de recherche et ne sont pas destinés à la fourniture à la filière triploïde commerciale. Six lots issus de ces croisements ont été produits et seront nommés 3n-A à 3n-F.

Tous les lots ont été conservés au LGPMM en environnement contrôlé (eau de mer traitée aux UV) et nourris *ad libitum*. Chaque lot d'animaux a été pesé et mesuré avant chaque expérience.

4.2. Infections expérimentales

4.2.1. Injection

Après mise à sec pendant une nuit, les animaux sont « anesthésiés » dans une solution de chlorure de magnésium 50 g/l pendant 3 à 4h. Les bactéries, préparées comme détaillé dans le paragraphe 2.2.1, à différentes concentrations sont injectées dans le muscle adducteur. Chaque condition est testée en triplicat à raison de dix huîtres par bac. Un lot témoin est injecté par un même volume d'eau de mer stérile. Après injection, les animaux sont immédiatement répartis dans des bacs de 3 l d'eau de mer oxygénés à 22°C et le suivi de mortalité est effectué pendant une semaine.

4.2.2. Cohabitation

Les animaux sont préalablement acclimatés à une température de 22°C (augmentation progressive de température dans la limite de 2°C. jour⁻¹). Des animaux moribonds obtenus 24 h après l'injection intramusculaire de 100 µl d'une suspension bactérienne ajustée à 10⁷ bactéries/ml (= animaux source), sont mis en contact avec les animaux receveurs (= animaux à tester) pendant 48 heures, puis retirés des bacs, à raison de 5 g d'huîtres infectées moribondes pour 100 g d'huîtres à infecter dans 1 l d'eau de mer. Des prélèvements d'eau de mer sont réalisés pendant ces 48 h afin d'estimer à posteriori par PCR en temps réel la quantité de bactéries excrétées. Le suivi de mortalité sur les triplicats de bacs de 10 à 15 animaux est effectué pendant 11 à 15 jours.

4.3. Recherche d'agents infectieux et suivi d'expression de gènes de l'hôte

4.3.1. Prélèvements

Les huîtres moribondes (incapables de se refermer) sont prélevées quotidiennement et conservées à -20°C avant recherche d'ADN d'agent infectieux.

Les animaux "témoins" acclimatés et conservés dans des conditions strictement identiques, ainsi que les animaux survivants sont prélevés en fin d'expérience (J6 ou J11), congelés en azote liquide et conservés à -80°C.

4.3.2. Recherche d'agents infectieux

A partir d'ADN extraits sur des mélanges de tissus (branchie + manteau) en utilisant le kit Qiagen DNA QiaAmp, la présence d'ADN de l'herpès virus OsHV-1 et de la bactérie *V. aestuarianus* a été recherchée par PCR en temps réel selon des protocoles officiels (Pepin et al., 2008; Saulnier et al., 2009)

4.3.3. Suivi d'expression de gènes : Extraction des ARN totaux, synthèse des ADN complémentaires et PCR quantitative

Le statut immunitaire des huîtres est déterminé par l'analyse de l'expression d'une combinaison d'une trentaine de gènes déjà caractérisés comme indicateur des capacités immunitaires d'huîtres résistantes à une infection bactérienne expérimentale (par *V. splendidus* et *V. aestuarianus*) ou à une mortalité *in situ* (de Lorgeril *et al.*, 2011; Schmitt *et al.*, 2013).

Les ARN totaux sont extraits des huîtres saines ou survivantes à des infections expérimentales par *V. aestuarianus* (broyat tissulaire total), en utilisant du TRIzol[®] Reagent selon le protocole du fournisseur (Invitrogen[®]), à raison de 1 ml de Trizol pour 100 mg de poudre. Les ARN totaux ont été quantifiés (spectrophotométrie nanodrop) et leur intégrité a été contrôlée par électrophorèse. Trois µg d'ARN totaux (pool de dix huîtres) ont été retro-transcrits pour chaque condition testée en utilisant le kit M-MLV Reverse Transcriptase selon le protocole du fournisseur (Invitrogen[®]). Un microlitre d'oligo dT (500µg/ml), et 1 µl de dNTP (10 mM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP) ont été ajoutés aux ARN totaux. Le mélange a été incubé 5 min. à 65°C, puis placé à 4°C, auquel ont été ajoutés 4 µl de 5X First-Strand Buffer, 2 µl DTT 0,1 M, 1 µl RNase OUT. Un microlitre de Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase a été ajouté au mélange, puis incubé 50 min à 37°C pour la synthèse de l'ADNc (complémentaire), suivie d'une inactivation de l'enzyme (70°C, 15 min). Les ADNc sont conservés à -20°C pour servir d'ADN matrice pour les analyses d'expression de gènes.

Les taux d'expression d'une trentaine de gènes présentés dans le [Tableau 6](#) ont été quantifiés par PCR en temps réel chez des familles d'huître saines non infectées ainsi que chez des huîtres survivantes à une infection expérimentale par *V. aestuarianus*. Les réactions de PCR en temps réel ont été réalisées avec un Light Cycler 480 (Roche) en plaque 384 puits. Cette technique basée sur l'amplification d'une séquence cible d'ADN en présence d'un fluorochrome (SYBR Green I) permet de quantifier l'ADN synthétisé. Chaque réaction est constituée de 3 µl de Master Mix Roche (HotStarTaq DNA polymerase, tampon de la polymerase, dNTP, fluorochrome et 5 mM de MgCl₂) et 1 µl de chaque amorce sens et anti-sens à 3 µM.

Pour une quantification de l'expression des gènes, on ajoute 1µl d'ADNc dilué au 1/8. Le programme de la PCR se déroule en trois étapes : activation de la polymérase (10 min à 95°C), 40 cycles composés de trois étapes: dénaturation (10 sec à 95°C), hybridation (20 sec à 57°C) et élongation (25 sec à 72°C avec mesure de la fluorescence pour quantifier l'ADN ciblé), et enfin une dénaturation lente avec mesure de la fluorescence pour obtenir la courbe de fusion afin de vérifier la spécificité de l'amplification.

Les expressions relatives de chaque gène sont calculées avec la formule $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Pfaffl, 2001) avec comme gènes de référence la moyenne de deux gènes d'expression constitutive (*Cg-RPL40* et *Cg-RPL7*). Les données d'expression sont ensuite traitées à l'aide du logiciel Statistica V 7.1 pour déterminer les variations d'expression (ANOVA Kruskal-Wallis, test de la médiane et Test U-Mann Whitney), et du logiciel Multiple Array viewer pour leur visualisation sous forme de classement hiérarchique des données.

Tableau 6 : Liste des gènes étudiés classés selon les fonctions qu'ils exercent.

Immune response	293	Interleukin 17
	220	MyD88
	122	Universal stress protein
	72	Metallothionein b
	351	Metallothionein a
	399	Metallothionein c
	189	Perlucin
	300	Heat shock 70
	130	Interferon-induced protein 44 (IFI44)
	303	32 kDa beta-galactoside-binding lectin
	304	D-galactoside-specific lectin
	306	Proline rich peptide
	307	Defensin
	163	Big defensin
	CM027	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) Box Polypeptide
	CM056	suppressor of cytokine
CM060	Interferon Gamma-Inducible Protein	
Cellular differentiation	8	Multiple epidermal growth factor b
	216	Placental protein
	312	Multiple epidermal growth factor a
	324	Early growth response protein 1 (Egr1)
	375	Dexamethasone-induced Ras-related protein
Cytoskeleton reorganisation	396	Acyl-CoA desaturase
	348	Calcineurin
	439	Myosin essential light chain
	441	Major vault protein
	401	Low-density lipoprotein receptor-related protein
Respiratory chain	422	Glutathione transferase omega
	283	Extracellular superoxide dismutase
cell adhesion-communication	420	Hemagglutinin/amebocyte aggregation factor
	284	Integrin beta-PS precursor
Pro- and anti-apoptose	378	Caspase-7 a
Unknown gene product	166	Unknown gene product 166

5. Résultats

Afin de pouvoir comparer la sensibilité de différents lots d'animaux (différents niveaux de ploïdie, différentes origines, différents fonds génétiques), il était indispensable de disposer d'un protocole expérimental robuste, *i.e.* connaître les conditions optimales que ce soit au niveau agent infectieux, environnement ou côté animal. Nous avons donc comparé différents protocoles (contamination par injection ou par simple contact avec des animaux infectés), différentes doses d'agent infectieux, différentes conditions environnementales (température, salinité, densité d'animaux) et différents animaux (classe d'âge et poids/taille).

Les principales mises au point de protocole expérimental ont concerné le mode de contamination et l'âge des animaux testés. Les résultats sont présentés dans le paragraphe 5.1. Les expériences de comparaison de lots ont ensuite été réalisées dans les conditions optimales permettant de reproduire la maladie de la façon la plus réaliste possible (paragraphe 5.2, 5.3, 5.4). Ce protocole a ainsi permis d'évaluer la sensibilité et taux de survie à l'infection à *V. aestuarianus* d'huîtres aux trait de vie différents (5.2 à 5.4) tout comme la composante immunitaire de cette sensibilité (5.5).

5.1. Mise au point de conditions expérimentales : protocoles infectieux et âge des animaux testés

Trois protocoles expérimentaux sont classiquement utilisés en pathologie expérimentale: (i) la balnéation ou mise en contact des animaux à tester avec de l'eau de mer artificiellement contaminée avec des bactéries cultivées en milieu riche (ii) l'injection intramusculaire de bactéries cultivées en milieu riche, (iii) la cohabitation ou mise en contact des animaux à tester avec des animaux infectés (obtenus par injection) excréant l'agent infectieux dans l'eau environnante.

Les expériences de balnéation se sont révélées peu reproductibles et ce, malgré des essais de complexification du microcosme (ajout de sédiment (Azandegbe *et al.*, 2010) ou d'algues favorisant la filtration des huîtres). Ce protocole n'a donc pas été retenu pour l'étude.

Les protocoles d'injection intramusculaire et de cohabitation ont, quant à eux, été testés sur des animaux au stade naissain (1,5 à 3 g) et âgés de 13-16 mois (20- 30 g). Afin de limiter l'impact des traits d'histoire de vie et d'éventuels autres agents infectieux, nous nous sommes limités à comparer ici des animaux conservés tout au long de leur vie dans des conditions contrôlées (écloserie/nurserie en eau de mer traitée, absence de mortalité anormale sur le lot); à l'exception des animaux de 3 ans, qui ont été suivis sur estran de 2011 à mai 2013, et qui ont connu un épisode de mortalité important en relation avec la détection d'OsHV-1 en 2011.

Des expériences d'injection intramusculaire ont permis d'observer des mortalités pour tous les animaux testés, avec des mortalités plus importantes et plus rapides chez des animaux de 13 mois (20 g), que chez des animaux de dix mois (3 g) : [Figure 6](#). Ainsi, dès trois jours après l'injection de la suspension bactérienne, les taux de mortalité ont atteint leur plateau et dépassent 80% quelle que soit la dose injectée pour des animaux de 20 g, alors que ces taux de mortalités ne sont atteints qu'à J6 pour des animaux de 3 g injectés avec 2.10^3 bactéries. Les animaux moribonds analysés collectés lors de ces expériences (n=30) présentaient tous dans leurs tissus des quantités d'ADN bactériens supérieures à 10^5 B/ 25 ng d'ADN total (et aucune détection d'ADN viral), et ce, quelle que soit la dose de bactéries initialement injectée.

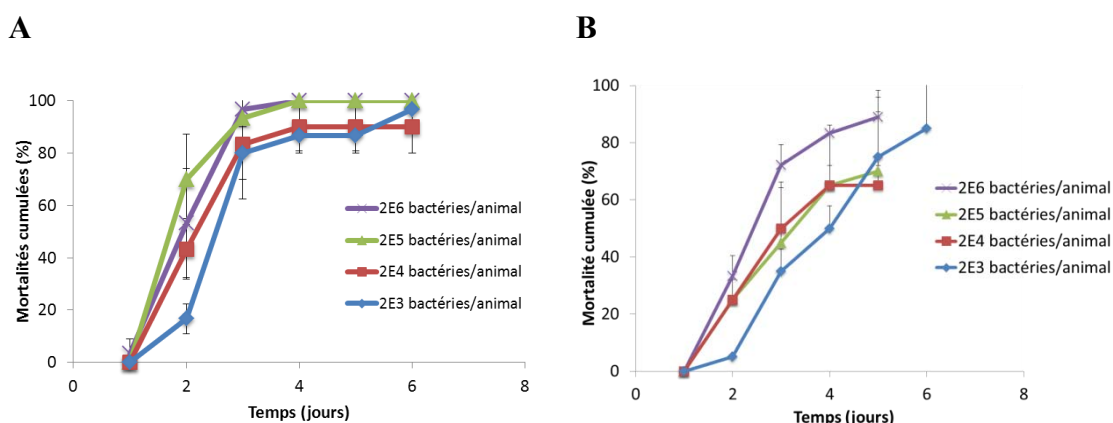


Figure 6 : Mortalités cumulées observées suite à l'injection intramusculaire d'une suspension de *V. aestuarianus* (souche 02/041) à différentes doses (de 2.10^6 à 2.10^3 bactéries par animal) (A) sur des animaux de 13 mois (20 g) (B) sur des animaux de 10 mois (3 g).

Ce protocole expérimental était utilisé depuis la description de l'espèce *V. aestuarianus* subsp. *francensis* (Garnier *et al.*, 2008), avec comme différence majeure que des doses de bactéries de l'ordre de 10^7 bactéries/animal étaient alors nécessaires pour induire des mortalités de >50%. Ces observations suggèrent que les animaux testés ici sont particulièrement sensibles à l'infection bactérienne. De plus, en utilisant ce protocole, et même avec des doses relativement faibles d'agent infectieux, les mortalités obtenues avec tous les lots d'animaux testés sont toutes importantes (les lots les moins sensibles présentant des mortalités cumulées de 70%) ce qui rend la comparaison de sensibilité des différents lots difficile. Ces expériences ont donc été complétées par des expériences de cohabitation (mise en contact pendant 48 h avec des animaux infectés dits "sources", mimant la contamination survenant dans le milieu).

Par cohabitation expérimentale, aucune mortalité n'a pu être induite sur les quatre lots de naissains testés (1,5 à 3 g), dans les 15 jours suivant la mise en contact avec des animaux "sources" infectés par *V. aestuarianus* 02/041. Il est important de noter que ces expériences ont été réalisées parallèlement à celles présentées dans les paragraphes 5.2, 5.3 et 5.4, c'est à dire dans des conditions expérimentales ayant permis

d'observer entre 20 et 90% de mortalités sur des animaux de 13 mois (20 g) ou de trois ans (53 - 83 g) ([Figure 7](#), [Figure 8](#), [Tableau 7](#)).

En conclusion, pour les huîtres au stade naissain, il a pu être observé que, même si des mortalités importantes peuvent être induites par injection de *V. aestuarianus*, la bactérie ne semble pas capable de coloniser et d'affecter ces animaux quand elle est simplement présente dans l'eau de mer.

A l'inverse, des animaux plus âgés sont affectés par la bactérie quel que soit le mode de contact. Le protocole de cohabitation expérimental a ainsi été retenu pour la suite du travail et les paragraphes suivants présentent les résultats obtenus sur différents lots d'huîtres de plus de 12 mois, suite à un contact avec de l'eau de mer contaminée par la bactérie *V. aestuarianus*.

5.2. Sensibilité à *V. aestuarianus* d'animaux adultes et d'origines différentes (captage naturel / écloserie) survivantes d'épisodes de mortalités en milieu naturel associés à la détection d'OsHV-1

Quatre groupes d'animaux adultes du premier plan de sauvegarde, âgés de trois ans pour un poids moyen compris entre 53 et 83 g, et ayant pour origine du captage naturel et des écloseries (privées ou LGPMM), ont été testés en laboratoire pour leur sensibilité à l'infection à *V. aestuarianus*, après s'être assurés (i) que la bactérie n'était pas détectée avant l'expérience (ii) que des mortalités non contrôlées n'apparaissaient pas au cours de leur acclimatation thermique (*i.e.* conditions plus favorables au développement de certaines maladies infectieuses).

Cette première expérience a été menée sur quatre groupes d'animaux de différentes origines (diploïdes issus d'écloserie, triploïdes issus d'écloserie, diploïdes correspondant à une souche sélectionnée pour ses capacités de survie sur estran, diploïdes issus de captage) ayant subi des mortalités anormales entre 25 et 75% pendant leur première année de vie sur estran en 2011 ([Tableau 7](#)). Au cours de ces épisodes de mortalité survenues dans le milieu, de fortes quantités d'ADN d'OsHV-1 ont été mises en évidence, suggérant l'implication de cet agent infectieux dans les épisodes observés (résultat du plan de sauvegarde PS2011 (Degremont *et al.*, 2011b)). En présence de la bactérie *V. aestuarianus* et dans les conditions expérimentales testées, l'ensemble des groupes testés présentait des mortalités cumulées moyennes comprises entre 24% et 34% au bout de 15 jours de suivi.

Ainsi, sur les animaux testés, il n'a pas été observé de sensibilité particulière des animaux issus d'écloserie ou de captage, ni de corrélation entre les mortalités enregistrées en année 1 sur estran et les mortalités expérimentales relevées en année 3 en présence de la bactérie à *V. aestuarianus*. Ces expériences n'ont cependant pas pu être reproduites (nombre limité d'animaux) et la confirmation ces premiers résultats n'a donc pas encore été apportée.

Tableau 7: Mortalités moyennes enregistrées sur estran (résultats tirés du plan de sauvegarde PS2013) et en infection expérimentale, sur des lots d'animaux diploïdes (2n) ou triploïdes (3n), issus d'écloserie ou de captage naturel, sélectionnés pour une meilleure survie à 1 an (R) ou non.

	Mortalité sur estran année 1 (infection à OsHV-1 suspecté)	Mortalité expérimentale année 2 (infection à <i>V. aestuarianus</i>)
2n éclo	70%	24%
2n captage	75%	24%
3n éclo	70%	30%
2nR éclo	25%	34%

5.3. Les animaux sélectionnés pour leur survie sur estran sont-ils plus résistants à différents agents pathogènes ?

Des animaux issus de la 3^{ème} génération de sélection massale pour la survie au stade naissain (Pop A – R et Pop B - R) et leurs témoins respectifs (Pop A – T et Pop B - T) ont été testés vis-à-vis de leur sensibilité aux infections à OsHV1 et à *V. aestuarianus*.

Ces expériences ont été réalisées au cours des mois de mars et avril 2013, sur des animaux âgés de 13 mois (Pop A - T : 19 g, Pop B - T: 23 g, Pop A - R : 20 g et Pop B - R : 23 g). Elles ont tout d'abord permis de confirmer la meilleure survie des animaux sélectionnés pour leur meilleure survie au stade naissain sur estran, lors d'une infection expérimentale à OsHV-1 (Figure 7A). Des sensibilités variables de ces mêmes lots ont été observées vis-à-vis de l'infection à *V. aestuarianus* (Figure 7B) avec des mortalités cumulées après 11 jours allant de 16% pour le lot Pop A - R à 66% de mortalité cumulée pour le lot témoin non sélectionné Pop B - T.

Les animaux moribonds analysés collectés lors de ces expériences (n=116) présentaient tous (A) dans le cas de l'infection par OsHV-1 μ var, des quantités d'ADN viral dans leur tissu supérieur à 1.10^4 copies/25 ng ADN total et pas d'ADN de *V. aestuarianus* et (B) dans le cas de l'infection par *V. aestuarianus* 02/041, des quantités d'ADN bactérien supérieures à 5.10^5 copies/25 ng d'ADN total et pas d'ADN viral quantifiable.

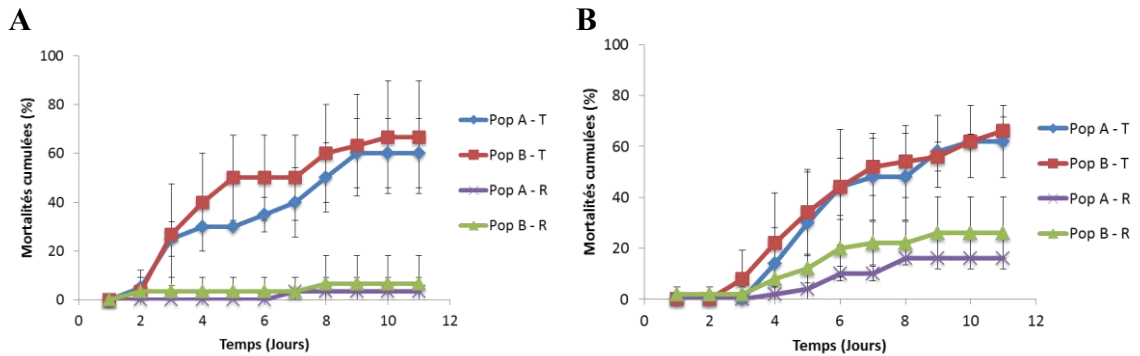


Figure 7 : Mortalités cumulées obtenues suite à la cohabitation avec des animaux moribonds infectés par (A) OsHV-1, (B) *V. aestuarianus* souche 02/041 à 22°C. Les graphiques correspondent à une expérience où chaque condition est testée en triplicats de bacs et qui a été renouvelée 2 fois dans le temps.

Les résultats obtenus suggèrent une **corrélation positive entre les caractères ‘survie sur estran pendant la première année de vie’, ‘survie face à une infection à OsHV-1’ et ‘survie face à une infection à *V. aestuarianus*’ pour ces animaux âgés d’une année (20-23g)**. Cependant, ces résultats ont été obtenus sur deux populations, chacune comportant un lot sélectionné et un lot témoin non sélectionné (soit quatre lots seulement), et donc un fond génétique restreint. Il paraît indispensable d’élargir le fond génétique en testant d’avantage de lots avant de conclure sur le potentiel lien entre les capacités de survie à différents agents infectieux. De même, le manque de matériel biologique n’a pas permis de continuer les expérimentations à d’autres stades, mais il est envisagé de tester la génération suivante de sélection massale au stade naissain (1-5 g), juvéniles (10-20 g) et adultes (> 20 g) dans le cadre du projet AESTU+ en 2014.

5.4. Sensibilité d'animaux de niveaux de ploïdie différents, estimée par des cohabitations expérimentales

La sensibilité vis-à-vis de l’infection à *V. aestuarianus* de six lots d’animaux diploïdes et de six lots d’animaux triploïdes, conservés tout au long de leur vie dans des environnements confinés, a été estimée par des expériences de cohabitation. Pour quatre des six lots d’animaux triploïdes, l’expérience a pu être reproduite à trois reprises entre le 08/02 et le 22/03/2013, les deux autres lots d’animaux ayant subi des mortalités non contrôlées juste avant la troisième expérience.

Les mortalités cumulées sont variables selon les expériences pour un même lot d’animaux, variant pour les lots 3n-F et 3n-C de 20% à 90% et de 40 à 80%, respectivement (Figure 8), et ce, malgré le contrôle des conditions expérimentales (température = 22°C, salinité = 34 ‰, quantité d’agent infectieux en contact = 5.10^5 bactéries/ml pendant 48h, souche *V. aestuarianus* 02/041).

Cette variabilité pourrait être liée aux conditions de stockage des animaux (qualité et quantité de l'alimentation) et à leur état physiologique en février et en mars 2013, mais également aux variations de poids des animaux testés pour chacune de ces trois expériences.

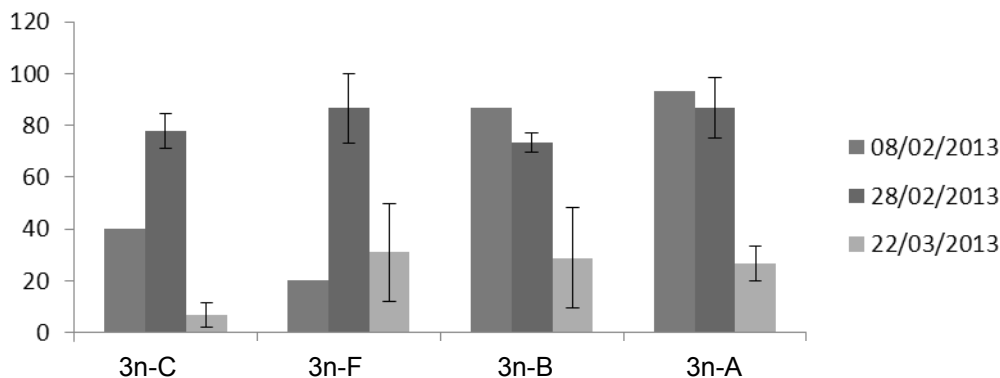


Figure 8: Mortalités cumulées observées suite à la cohabitation d'animaux avec des animaux « source » injectés avec *V. aestuarianus* 02/041. Suite à deux jours de contact avec des animaux moribonds, les différents lots d'animaux triploïdes (3n-C, 3n-F, 3n-B et 3n-A) ont été suivis pendant sept à 12 jours. La quantité de bactéries excrétées par les animaux infectés moribonds a été déterminée dans chacun des bacs et atteignait en moyenne 5.10^5 bactéries/ml.

Afin de tester la potentielle corrélation entre les mortalités induites sur un même lot et le poids des animaux sélectionnés au sein de ce lot, les données des trois expériences ont été regroupées et sont représentées dans la [Figure 9](#). Une corrélation positive entre ces deux paramètres apparaît (coefficient de corrélation: 0.52, p-value: 0.039), **plus le poids des animaux testés est important, plus les mortalités observées sur ce lot semblent fortes.**

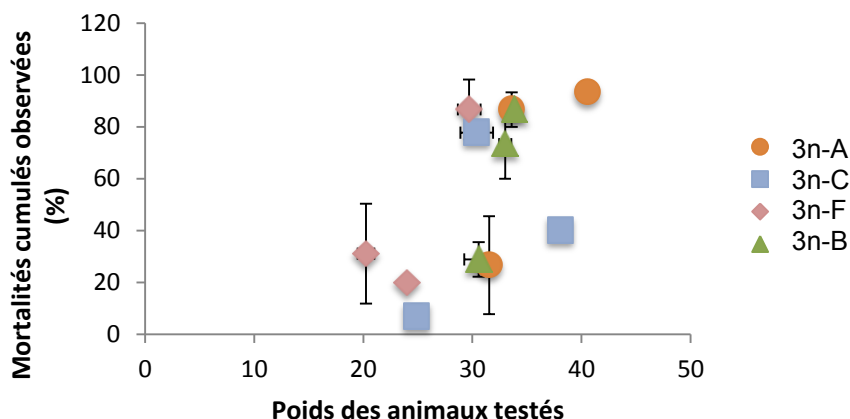


Figure 9: Corrélation entre les mortalités cumulées obtenues suite à des infections expérimentales par cohabitation et le poids des animaux sélectionnés dans chaque lot (4 lots d'animaux triploïdes testés en triplicats de 15 animaux à trois reprises).

Pour l'ensemble des lots d'animaux diploïdes (six lots) et triploïdes (six lots) de plus d'1 an comparés tout au long de l'année 2013, une représentation similaire a été réalisée (Figure 10). Une corrélation positive a également été établie entre le poids des animaux et le pourcentage de mortalité obtenu suite à un contact de 48 h avec des animaux "sources" infectés par *V. aestuarianus* (p-value: 0,001, coefficient de corrélation $r = 0,75$).

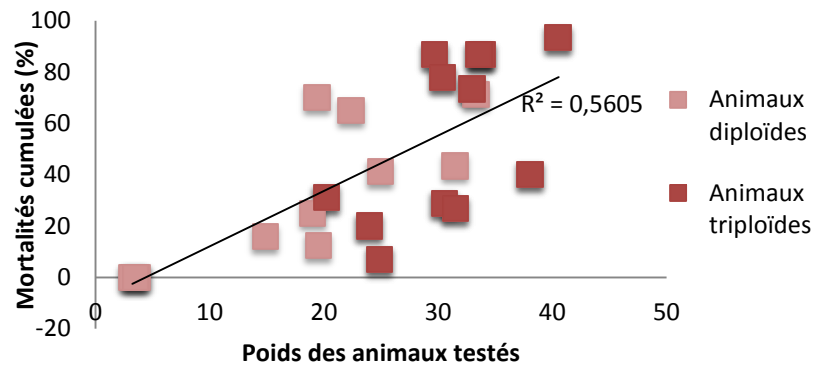


Figure 10: Corrélation entre les mortalités cumulées observées suite à des infections expérimentales par cohabitation et le poids des animaux testés dans chaque lot (12 lots d'animaux diploïdes et 6 lots d'animaux triploïdes). Le coefficient de détermination R^2 est indiqué sur le graphique.

En considérant l'ensemble des lots étudiés, les mortalités cumulées moyennes observées suite à une infection par cohabitation sont de 38 % (erreur-type = 6%) et 55% (erreur-type = 9%) pour les lots diploïdes et triploïdes, respectivement, mais non significativement différentes entre niveau de ploïdie ($F = 0,59$, p-value = 0,44), et ce, malgré la réelle différence de poids moyen observée (16,8 g et 30,8 g pour lots diploïdes et triploïdes ; $F = 4,14$, p-value = 0,03) (Figure 11). Ce constat peut être le résultat des fonds génétiques et des niveaux de sélection différents entre les lots testés.

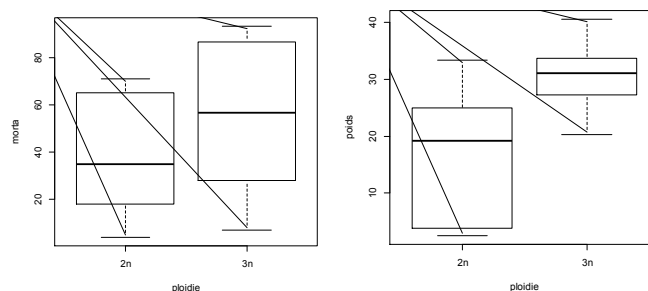


Figure 11: Mortalités cumulées suite au challenge expérimental face à *V. aestuarianus* (A) et poids des animaux testés (B) pour l'ensemble de lots diploïdes (2n) et triploïdes (3n).

En conclusion, il apparaît qu'au-delà du fond génétique (lot d'animaux), et de la ploïdie, le poids des animaux est un critère majeur influençant leur sensibilité. Des différences de sensibilité entre lots (et au sein d'un lot selon le poids des animaux) ont été observées chez les diploïdes et chez les triploïdes.

5.5. Expression génique différenciée associée au niveau de sensibilité à l'infection bactérienne ?

L'évaluation du statut immunitaire de lots d'huîtres par des analyses d'expression de gènes a été réalisée pour deux objectifs différents : (i) caractériser le statut immunitaire d'huîtres survivantes à une infection expérimentale par *V. aestuarianus* versus huîtres saines, (ii) déterminer les différences d'expression de gènes au niveau basal (huîtres non stimulées) entre des lots présentant des capacités de survie différenciées lors d'une infection à *V. aestuarianus* en conditions expérimentales (animaux diploïdes ou triploïdes). Les gènes sélectionnés pour ces analyses appartiennent à différentes fonctions biologiques (dont la réponse immunitaire), précédemment associée aux capacités immunitaires d'huîtres survivantes à une infection expérimentale ou à une mortalité *in situ* (de Lorgeril *et al.*, 2011; Schmitt *et al.*, 2013).

Existe-t-il une expression génique différenciée chez des huîtres creuses survivantes à une infection à *V. aestuarianus*?

Dans le cadre de la caractérisation du statut immunitaire d'huîtres survivantes à une infection expérimentale, des huîtres survivantes de quatre lots d'huîtres issues de deux infections expérimentales indépendantes ont été analysées. **La comparaison des huîtres survivantes versus huîtres saines montre une discrimination de ces deux groupes d'huître par les taux d'expression de l'ensemble des gènes sélectionnés (Figure 12A).** Deux groupes de gènes présentent des taux d'expression opposés entre des huîtres survivantes versus huîtres saines. Les gènes du groupe A (sept gènes) sont surexprimés chez les huîtres survivantes alors que les gènes du groupe B (29 gènes) semblent être réprimés chez les huîtres survivantes. Bien que plus faible en nombre, les gènes du groupe A semblent les plus robustes pour caractériser les huîtres survivantes (Figure 12B). Les gènes du groupe B participent aussi à la discrimination des deux groupes d'huîtres (saines vs. survivant), mais présentent aussi des variations d'expression associées aux lots d'huître ou aux expérimentations. Les gènes présentant des variations d'expression significatives sont présentés dans le [Tableau 8](#). A noter que les gènes du groupe A surexprimés chez les lots survivants se retrouvent dans trois groupes fonctionnels: la réponse immunitaire, la différenciation cellulaire et dans la réorganisation du cytosquelette.

Existe-t-il des variations de l'expression de gènes au niveau basal, associées à la sensibilité différentielle de lots?

Tout d'abord, l'expression génique chez différentes lignées d'huîtres saines triploïdes de fonds génétiques différents a été comparée. Pour cela des animaux triploïdes sains ont été prélevés au cours d'une expérimentation. Les taux d'expression de l'ensemble des gènes sélectionnés discriminent deux groupes de conditions (Figure 13A), le groupe 1 réunissant les lots 3n-A et 3n-C et le groupe 2 réunissant une majorité des lots 3n-B et 3n-F. Cette discrimination des lots repose sur deux groupes d'expression de gènes, le groupe A plus exprimé chez les lots 3n-A et 3n-C (groupe 1) alors que le groupe B est plus exprimé chez les lots 3n-B et 3n-F (groupe 2). Cette discrimination des lots reste valable par l'analyse des gènes présentant des variations d'expression significatives (Figure 13B et Tableau 9). Il apparaît un plus grand nombre de gènes surexprimés dans les lots 3n-B et 3n-F (groupe 2). De plus, dans le petit groupe de gènes surexprimés dans les lots 3n-A et 3n-C (Tableau 9, groupe A) sont retrouvés uniquement des gènes précédemment associés aux lots d'huître survivants à *V. aestuarianus* (Tableau 8, groupe A). Il serait intéressant de confronter ces résultats à des données de susceptibilité, mais les résultats obtenus en pathologie expérimentale étant particulièrement variables selon le poids des animaux (paragraphe 5.4, Figure 8), nous ne pouvons à l'heure actuelle pas trancher quant à une potentielle sensibilité différentielle de ces lots.

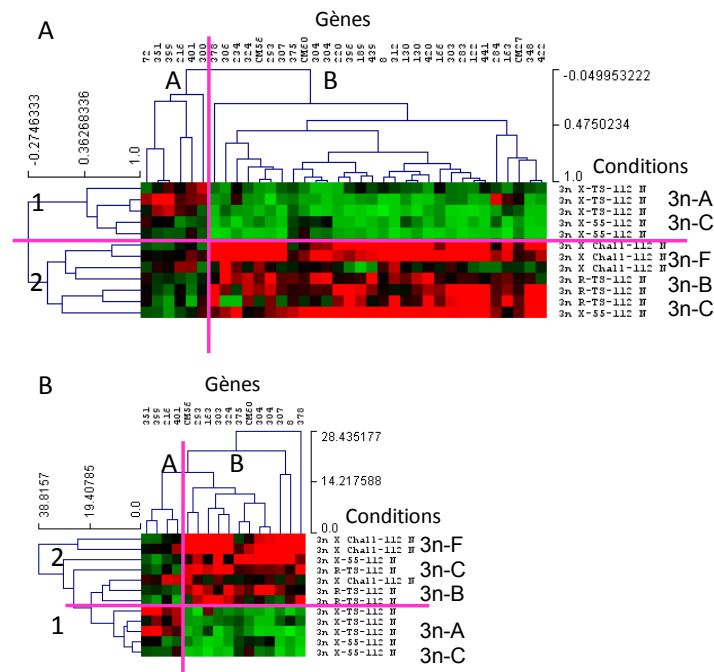


Figure 13: Discrimination de lots d'huîtres creuses saines triploïdes de fond génétique différent par les taux d'expression des gènes sélectionnés. Classements hiérarchiques des données de PCR temps réel pour (A) les 36 gènes analysés et pour (B) les 16 gènes différemment exprimés entre les lots d'huîtres. Les 12 conditions analysées sont des répliques biologiques de 4 lots d'huîtres naïves (3n-A, 3n-B, 3n-C et 3n-F). Chaque case de la matrice correspond à l'expression d'un gène dans une condition, dont le taux d'expression est représenté en fonction d'un dégradé de couleur allant du vert (sous expression) au rouge (sur expression). Les classements hiérarchiques des conditions discriminent deux groupes de conditions, le groupe 1 composé des lots 3n-A et 3n-C et le groupe 2 composé de 3n-B et 3n-F. Les classements hiérarchiques des gènes montrent deux groupes d'expression, le groupe A surexprimé chez les 3n-A et 3n-C et le groupe B surexprimé chez les 3n-B et 3n-F

Tableau 9: Gènes différentiellement exprimés entre les lots d'huîtres saines

Fonction	identifiant	Gène	groupe
Réponse immunitaire	293	Interleukin 17	B
	351	Metallothionein a	A
	399	Metallothionein c	A
	303	32 kDa beta-galactoside-binding lectin	B
	304	D-galactoside-specific lectin	B
	307	Defensin	B
	163	Big defensin	B
	CM056	suppressor of cytokine	B
	CM060	Interferon Gamma-Inducible Protein	
Différenciation cellulaire	8	Multiple epidermal growth factor b	B
	216	Placental protein	A
	324	Early growth response protein 1 (Egr1)	B
	375	Dexamethasone-induced Ras-related protein	B
Réorganisation du cytosquelette	401	Low-density lipoprotein receptor-related protein	A
Apoptose	378	Caspase-7 a	B

D'autre part, nous avons comparé l'expression génique d'huîtres saines appartenant à différentes lignées d'huître diploïdes présentant des sensibilités différentes à l'infection bactérienne. Les taux d'expression des gènes sélectionnés permettent de discriminer des lots d'huîtres diploïdes à sensibilités différentes (Figure 14). En effet, les taux d'expression de l'ensemble des gènes permettent de discriminer deux groupes de conditions, le groupe 1 réunissant les lots R des deux populations et le groupe 2 réunissant les lots T des deux populations. Les gènes permettant cette discrimination appartiennent à différentes fonctions biologiques (réponse immunitaire, différenciation cellulaire, réorganisation du cytosquelette, communication-adhésion cellulaire ou stress oxydatif) et sont en majorité plus exprimés chez les lots Pop A – T et Pop B – T qui présentent la plus grande sensibilité à l'infection à *V. aestuarianus*.

En conclusion, il apparaît possible de discriminer des groupes d'huîtres (diploïdes ou triploïdes) de fond génétique divers et présentant des sensibilités différentes à l'infection à *V. aestuarianus* en suivant l'expression de certains gènes. En outre, les taux d'expression de gènes impliqués dans l'immunité et dans d'autres grands processus biologiques, permettent aussi de discriminer des lots d'huître survivants à une infection à *V. aestuarianus* de lots d'huître saines. Le développement d'une approche globale et dynamique de transcriptomique (RNAseq) sur des phénotypes contrastés devrait permettre de définir l'ensemble des processus associés à des sensibilités différentes à l'infection bactérienne.

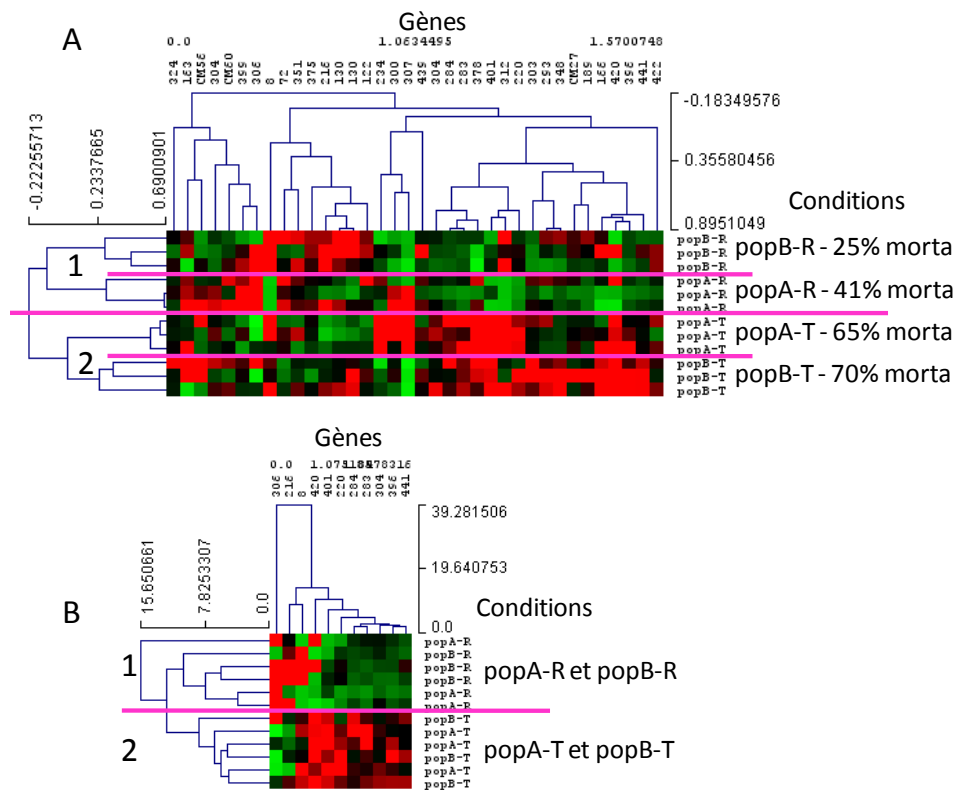


Figure 14: Discrimination de lots d'huîtres creuses saines diploïdes présentant des taux de survie différents lors d'une infection *V. aestuarianus* par les taux d'expression des gènes sélectionnés. Classements hiérarchiques des données de PCR en temps réel pour (A) les 36 gènes analysés et pour (B) les 11 gènes différemment exprimés entre les lots d'huîtres. Les 12 conditions analysées sont des réplicats biologiques de quatre lots d'huîtres saines (Pop A – T, Pop B – T, Pop A – R et Pop B - R). Chaque case de la matrice correspond à l'expression d'un gène dans une condition, dont le taux d'expression est représenté en fonction d'un dégradé de couleur allant du vert (sous expression) au rouge (sur expression). Les classements hiérarchiques des conditions discriminent deux groupes de conditions, le groupe 1 composé des lots R des deux populations et le groupe 2 composé des lots T des deux populations.

Tableau 10: Gènes différemment exprimés entre huîtres creuses diploïdes saines appartenant à différents lots

Fonction	identifiant	Gène
Réponse immunitaire	220	MyD88
	304	D-galactoside-specific lectin
	306	Proline rich peptide
Différenciation cellulaire	8	Multiple epidermal growth factor b
	216	Placental protein
Réorganisation du cytosquelette	396	Acyl-CoA desaturase
	441	Major vault protein
	401	Low-density lipoprotein receptor-related protein
Communication-adhésion cellulaire	420	Hemagglutinin/amebocyte aggregation factor
	284	Integrin beta-PS precursor
stress oxydatif	283	Extracellular superoxide dismutase

6. Discussion

6.1. Obj. 1. Virulence et diversité bactérienne

Comparaison de la virulence des souches in vivo

Dans les conditions expérimentales testées, en comparaison avec la souche 02/041 faisant référence, les différentes souches virulentes isolées en 2012 ont toutes pu être classées en tant que souches hautement virulentes, c'est-à-dire capable d'induire à faible dose (100 bactéries/ animal) plus de 80% de mortalité.

Même si de tels niveaux de virulence sont comparables avec ceux de souches isolées dans le début des années 2000, nous pouvons nous interroger sur une potentielle évolution de la proportion de souches hautement virulentes présentes dans l'environnement et dans les animaux. Les souches hautement virulentes, qu'elles appartiennent au clade A ou au clade B, pourraient avoir été favorisées par des conditions environnementales particulières. Des données seront acquises par une étude de plus grande ampleur s'appuyant sur la collection de souches de l'Ifremer (LNR/LGPMM La Tremblade, collection de plus de 200 souches de *V. aestuarianus* depuis 2006; LPI, collection depuis 2001). Il faut néanmoins signaler que la plupart des souches présentes dans ces collections ont été isolées dans le cadre d'épisodes de mortalité et ne reflètent pas la diversité environnementale. De nouveaux échantillonnages visant à isoler plus de souches environnementales et dans différents habitats, sont ainsi prévus dans le cadre de l'ANR Opopop 2014-2018 (porteur F. Le Roux, Ifremer).

De plus, la comparaison de paramètres immunitaires *in vivo* (capacité de phagocytose des hémocytes d'huîtres) suggère des mécanismes d'action divergents. En effet, même si les deux souches 02/041 et 12/016 induisent de fortes mortalités chez les huîtres, seule la souche 12/016 semble affecter le système immunitaire des animaux.

La virulence bactérienne est une notion quantitative qui traduit la capacité d'un micro-organisme à infecter et à causer des dommages à son hôte pouvant aller jusqu'à la mort, mais elle ne traduit en aucun cas la façon dont ces dommages sont induits (Casadevall and Pirofski, 2001). Elle s'appuie sur un ensemble de facteurs de virulence qui s'expriment chez l'animal et mènent à la maladie.

Les premiers résultats obtenus ici suggèrent que certaines souches pourraient employer des mécanismes de virulence différents, tout en menant à des niveaux de virulence comparable (souches hautement virulentes menant à >80% de mortalité suite à l'injection de 100 bactéries/animal).

C'est maintenant en comparant la pathogénèse (*i.e.* ensemble de mécanismes de virulence et des réponses de l'hôte amenant au développement de la maladie) pour différentes souches bactériennes que nous pourrons savoir si les souches de *V. aestuarianus* actuellement rencontrées dans les élevages utilisent *in vivo* le même répertoire de virulence et sont donc réellement comparable à celles isolées précédemment.

Comparaison de facteurs de virulence des souches *in vitro*

Dans une première approche visant à comparer les mécanismes employés par les bactéries pour pénétrer, se maintenir et se multiplier dans leur hôte, deux souches de *V. aestuarianus* (02/041 et 12/016) ont été comparées par une approche de protéomique en gel 2D. Ces souches présentent chez l'animal des niveaux de virulence comparables, mais cette approche comparative a permis de mettre en évidence que ces bactéries sécrètent *in vitro* des protéines différentes, et en particulier que la souche 12/016 n'exprime pas *in vitro* la métalloprotéase Vam, un facteur de virulence précédemment identifié chez *V. aestuarianus* (Labreuche *et al.*, 2010).

Il était jusqu'à lors considéré que les souches pathogènes de *V. aestuarianus* sont capables de causer des dommages chez leur hôte via la sécrétion d'un ensemble de facteurs de virulence comme des protéases, capables d'inhiber la capacité de phagocytose des cellules immunitaires. Ces études ont été basées sur les souches 01/032 et 02/041 (Dubief and Nicolas, 2013; Labreuche, 2006). Cependant, lors de la comparaison des facteurs de virulence, nous avons pu observer que les protéines sécrétées *in vitro* par la souche 12/016 n'exercent pas d'activité protéasique et ne sont pas capables de moduler les capacités de phagocytose des hémocytes d'huîtres. A l'inverse, ces produits extracellulaires possèderaient une capacité hémolytique. Ces résultats suggèrent que les mécanismes de virulence que pourrait employer la souche 12/016 seraient différents de ceux connus pour les souches 01/032 et 02/041, même si la comparaison d'un si petit nombre de souches ne permet de généraliser ces observations.

Diversité des souches

La comparaison de ces mêmes souches, isolées de sédiment, de zooplancton, d'huîtres vivantes ou moribondes, ou de coques entre 2001 et 2007 et à partir de 2012, montre un profil quasi clonal (analyses des VNTR et de la présence de gènes de virulence), ce qui ne permet donc pas de suggérer l'émergence d'un génotype particulier en 2012.

L'analyse des génomes de 14 souches de *V. aestuarianus* a permis de mettre en évidence deux lignées au sein de l'espèce, sans corrélation avec l'année d'isolement ni le niveau de virulence des souches. L'existence de ces lignées à l'aide de nouveaux marqueurs discriminants doit être confirmée sur l'ensemble de la collection de souches de *V. aestuarianus* disponibles (LPI/LGPM). De plus, par génomique comparative et fonctionnelle, les gènes de virulences clés communs et spécifiques à chaque lignée seront identifiés. De premières expériences de génétique inverse ont d'ores et déjà permis de sélectionner une souche génétiquement modifiable (12/016).

La différenciation de ces lignées peut résulter d'une spécialisation de populations écologiquement distinctes (Hunt *et al.*, 2008). Une telle spécificité à un/plusieurs habitat(s), ainsi que les gènes à l'origine de cette spécialisation/adaptation à l'habitat seront recherchés. Enfin, de futurs travaux seront entrepris sur la fonction de ces potentiels gènes adaptatifs dans l'évolution des bactéries et dans l'apparition de nouvelles formes de virulence.

6.2. Obj. 2. Sensibilité des animaux

*Sensibilité à l'infection à *V. aestuarianus* d'huîtres creuses au stade naissain*

Même si des mortalités importantes peuvent être induites par injection de *V. aestuarianus* chez des huîtres creuses au stade naissain (animaux de moins d'un an), la bactérie ne semble capable d'infecter les animaux à ce stade quand elle est présente dans l'eau de mer. Cette classe d'âge d'animaux apparaît comme peu/pas sensible à l'infection à *V. aestuarianus*. Cependant, il est important de limiter les conclusions de cette étude aux conditions testées (suivi sur deux semaines). Des mortalités décrites comme chroniques (taux de mortalité instantané faible, mais mortalités cumulées importantes) sont parfois rapportées sur cette classe d'âge d'animaux et un impact à long terme de la bactérie sur ces animaux doit être également exploré.

En comparaison, les classes d'âge supérieures ont présenté des mortalités importantes après une infection par cohabitation (la bactérie se trouvant dans l'eau des bacs). Ces résultats sont en accord avec les données du réseau de pathologie des mollusques Repamo, qui a recensé depuis fin 2011 un nombre important de cas de hausse de mortalité chez des huîtres adultes associés à la détection de la bactérie (François *et al.*, 2013).

Enfin, seul un nombre limité de lots d'animaux de fonds génétiques différents (et à un seul âge) a été ici testé. Il sera important de comparer les mêmes lots d'animaux à différents âges au cours de leur vie. Une telle étude sera prochainement réalisée dans le cadre de la thèse de Patrick Azema et de l'action AESTU+.

*Sensibilité à l'infection à *V. aestuarianus* d'animaux de captage/d'écloserie, sélectionnés ou non*

La sensibilité à l'infection à *V. aestuarianus* d'animaux de trois ans, issus de captage naturel ou d'écloseries a été testée expérimentalement. Aucune différence de sensibilité n'a été observé que ce soit selon l'origine (captage/écloserie), ni selon certains traits d'histoire de vie (mortalités enregistrées sur le lot en année 1 sur estran). Il faut noter que ces expériences n'ont pas pu être reproduites (faute d'un nombre suffisant d'animaux) pour confirmer ou non ces premiers résultats.

De plus, la comparaison de lots issus de trois années de sélection massale (opérée sur estran pendant l'été, au moment des épisodes de mortalités associés à la détection de l'herpès virus OsHV-1) suggère une corrélation positive entre les caractères 'survie sur estran pendant la première année de vie', 'survie face à une infection à OsHV-1' et 'survie face à une infection à *V. aestuarianus*' pour des animaux âgés d'une année (20-23g). Cependant, ces résultats ont été obtenus sur deux populations chacune comportant un lot sélectionné et un lot témoin non sélectionné (soit quatre lots seulement). Il paraît indispensable de tester d'avantage de lots avant de conclure sur le potentiel lien entre les capacités de survie à différents agents infectieux. La prise en compte de la sensibilité à différents agents infectieux

(*V. aestuarianus*, OsHV-1 et d'autres vibriens comme *V. splendidus*) des lots d'animaux paraît indispensable pour sélectionner des animaux présentant une robustesse générale plutôt qu'une meilleure résistance vis à vis de l'infection induite par un agent infectieux donné.

Sensibilité à l'infection à *V. aestuarianus* d'animaux triploïdes

Afin de comparer la sensibilité d'animaux de ploïdie différente, six lots d'animaux triploïdes ont été testés à plusieurs reprises. La sensibilité à l'infection à *V. aestuarianus* de ces différents est apparue variable, avec en particulier une influence du poids des animaux. Chez les huîtres, les animaux triploïdes présentant généralement des poids supérieurs aux animaux diploïdes à âge égal (Degremont *et al.*, 2011a; Degremont *et al.*, 2012), ces deux critères devront systématiquement être pris en compte dans les futures expériences de comparaison.

Des différences de sensibilité entre lots (et au sein d'un lot selon le poids des animaux) ont été observées chez les animaux diploïdes et chez les animaux triploïdes, sans sensibilité particulière associée à un niveau de ploïdie.

Lien entre le statut immunitaire des animaux et leur sensibilité expérimentale à *V. aestuarianus*

L'analyse différentielle de gènes sélectionnés a permis de mettre en évidence des variations de leur taux d'expression capables de discriminer des groupes d'huîtres (diploïdes ou triploïdes) de fonds génétiques différents et/ou présentant des sensibilités différentes à l'infection à *V. aestuarianus*.

Ces taux d'expression permettent également de discriminer des lots d'huîtres survivantes après une infection à *V. aestuarianus* de lots d'huître saines, suggérant leur implication potentielle dans de meilleures capacités de survie. Ces résultats bien qu'ils doivent encore être validés sur de nouveaux lots pour s'assurer de leur robustesse (cf. programme « AESTU + »), ouvrent des perspectives pour le développement d'outils de pronostic des capacités de survie d'huîtres et l'analyse de souches d'huîtres d'intérêt en support aux programmes de sélection.

7. Conclusions générales

Les objectifs de cette étude étaient de déterminer si l'émergence/la ré-émergence de *V. aestuarianus* était associée (i) à l'apparition d'un génotype bactérien particulier et/ou (ii) à une sensibilité accrue de certains animaux.

Comme la souche 02/041 faisant référence, les différentes souches isolées en 2012 ont toutes pu être classées en tant que souches hautement virulentes, c'est à dire capable d'induire à faible dose (100 bactéries/ animal) plus de 80% de mortalité. De plus, les DL50 calculées pour des souches isolées avant 2007 ou en 2012 sont du même ordre de grandeur, ce qui suggère un niveau de virulence comparable. Ces mêmes souches, isolées de sédiment, de zooplancton, d'huîtres vivantes ou moribondes, ou de coques entre 2001 et 2007 et à partir de 2012, présentent un profil quasi clonal (analyses des VNTR et de la présence de gènes de virulence), qui ne permet pas de suggérer l'émergence d'un génotype particulier en 2012. Ces résultats sont enfin confortés par l'analyse de génomes complets **ne mettant pas en évidence de génotype particulier** au cours de l'année 2012, mais l'existence de deux clades au sein de l'espèce, dont la signification reste à préciser.

Cependant, même si ces souches sont proches phylogénétiquement, la comparaison *in vivo* et *in vitro* de deux d'entre elles suggère qu'elles emploieraient des mécanismes de virulence différents, tout en menant à des niveaux de virulence comparable (>80% de mortalité suite à l'injection de 100 bactéries/animal). Par rapport aux travaux réalisés précédemment (Garnier *et al.*, 2008; Labreuche *et al.*, 2006a) de façon globale, **les animaux testés dans le cadre de cette étude se sont révélés tous très sensibles** à l'infection à *V. aestuarianus*, et en particulier les animaux de plus d'un an. Ces observations peuvent suggérer une diminution des capacités de défense des huîtres vis à vis de l'infection bactérienne, cette réduction pouvant être liées aux animaux eux-mêmes ou bien aux conditions d'environnement rencontrées par ces animaux. Ces deux hypothèses ne sont pas exclusives. Comme autre caractéristique, *V. aestuarianus* semble capable d'infecter des animaux de plus d'un an quand elle est simplement présente dans l'eau de mer, mais pas des huîtres au stade naissain. Les animaux de plus d'un an issus de **captage naturel ou d'écloserie, 2n ou 3n présentent des sensibilités à l'infection bactérienne comparables** dans les conditions expérimentales testées. Par contre, la comparaison de lots issus de trois années de sélection massale suggère une corrélation positive entre les caractères 'survie sur estran pendant la première année de vie', 'survie face à une infection à OsHV-1' et 'survie face à une infection à *V. aestuarianus*' pour des animaux âgés d'une année (20-23g).

Par ailleurs, la comparaison de l'expression d'un panel de gènes chez différents lots d'huîtres offre la possibilité de discriminer des huîtres par rapport à leur survie à la suite d'une infection à *V. aestuarianus*. Après confirmation des résultats présentés ici sur un plus large panel d'animaux (fonds génétiques et traits d'histoire de vie, programme DPMA 2014 « AESTU+ »), des études fondamentales sur la pathogenèse de cette maladie (facteurs de virulence bactériens, cibles cellulaires et réponses de l'hôte ...) seront entreprises dans le cadre de programmes de recherche spécifiques.

8. Références bibliographiques

- Artigaud, S., et al., 2013. Identifying differentially expressed proteins in two-dimensional electrophoresis experiments: inputs from transcriptomics statistical tools. *Bioinformatics*. 29, 2729-34.
- Azandegbe, A., et al., 2010. Occurrence and seasonality of *Vibrio aestuarianus* in sediment and *Crassostrea gigas* haemolymph at two oyster farms in France. *Dis Aquat Organ*. 91, 213-21.
- Casadevall, A., Pirofski, L., 2001. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *Journal of Infectious Diseases*. 184, 337-44.
- Castresana, J., 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol*. 17, 540-52.
- Daubin, V., et al., 2002. A phylogenomic approach to bacterial phylogeny: evidence of a core of genes sharing a common history. *Genome Res*. 12, 1080-90.
- De Decker, S., et al., 2011. Responses of diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* to *Vibrio* infection in relation to their reproductive status. *Journal of Invertebrate Pathology*. 106, 179-191.
- de Lorgeril, J., et al., 2011. Whole transcriptome profiling of successful immune response to *Vibrio* infections in the oyster *Crassostrea gigas* by digital gene expression analysis. *Plos One*. 6, e23142.
- Degremont, L., et al., Evaluation de la survie du naissain de captage naturel chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* en fonction de la période des pontes à partir de lots sélectionnés pour les caractères de survie et efforts de reproduction. Contrat de projets Etat-Région Poitou-Charentes 2007-2013 - Convention n°08/PRC-A-29 <http://archimer.ifremer.fr/doc/00065/17643/>. 2011a.
- Degremont, L., et al., 2012. Triploid Oysters in the Chesapeake Bay: Comparison of Diploid and Triploid *Crassostrea virginica*. *Journal Of Shellfish Research*,. 31, 21-31.
- Degremont, L., et al., Plan de sauvegarde 2010 : synthèse des résultats 2010-2011. Rapport Convention DPMA-IFREMER n° 10/1218518/NF relative à la mise en place d'un plan d'approvisionnement de sauvegarde 2010 de la filière ostréicole. 55p. 2011b.
- Delaporte, M., et al., 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species-*Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Experimental Biology*. 206, 3053-64.
- Dubief, B., Nicolas, J., Caractérisation du mécanisme de virulence d'une nouvelle souche de *Vibrio aestuarianus*, pathogène de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. In: UBO, (Ed.). Mémoire de master 2, 2013.
- Edgar, R. C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 32, 1792-7.
- Fleury, E., Huvet, A., 2012. Microarray analysis highlights immune response of pacific oysters as a determinant of resistance to summer mortality *Mar Biotechnol* 14, 203-17.

- François, C., et al., Bilan 2012 du réseau Repamo. 2013, pp. 64 pp. Direct access : <http://www.ifremer.fr/repamo/Documentation/Rapports-d-activites>.
- Gagnaire, B., et al., 2004. In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish & shellfish immunology*. 16, 501-12.
- Garnier, M., et al., 2007. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microbial Ecology*. 53, 173-186.
- Garnier, M., et al., 2008. Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Syst Appl Microbiol*. 31, 358-365.
- Guindon, S., 2010. Bayesian estimation of divergence times from large sequence alignments. *Mol Biol Evol*. 27, 1768-81.
- Hirosawa, M., et al., 1993. MASCOT: multiple alignment system for protein sequences based on three-way dynamic programming. *Comput Appl Biosci*. 9, 161-7.
- Huerta-Cepas, J., et al., 2010. ETE: a python Environment for Tree Exploration. *BMC Bioinformatics*. 11, 24.
- Hunt, D. E., et al., 2008. Resource partitioning and sympatric differentiation among closely related bacterioplankton. *Science*. 320, 1081-5.
- Labreuche, Y., Caractérisation de la virulence d'une souche de *Vibrio aestuarianus*, pathogène de l'huître *Crassostrea gigas*. Université de Bretagne Occidentale, Brest, 2006, pp. 293.
- Labreuche, Y., et al., 2006a. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes and Infection*. 8, 2715-2724.
- Labreuche, Y., et al., 2010. *Vibrio aestuarianus* zinc metalloprotease causes lethality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and impairs the host cellular immune defenses. *Fish & Shellfish Immunology*. 29, 753-758.
- Labreuche, Y., et al., 2006b. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental & Comparative Immunology*. 30, 367-379.
- Le Roux, F., et al., 2011. Virulence of an emerging pathogenic lineage of *Vibrio nigripulchritudo* is dependent on two plasmids. *Environ Microbiol*. 13, 296-306.
- Le Roux, F., et al., 2009. Genome sequence of *Vibrio splendidus*: an abundant planctonic marine species with a large genotypic diversity. *Environmental Microbiology*. 11, 1959-1970.
- Liu, P. V., 1957. Survey of hemolysin production among species of *Aeromonas hydrophila* with reduced virulence for fish. *Infect Immun*. 74, 718-727.
- Pepin, J. F., et al., 2008. Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *Journal of Virological Methods*. 149, 269-276.
- Pfaffl, M. W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 29, e45.

Saulnier, D., et al., 2009. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: A useful tool for epidemiologic studies. *Journal of Microbiological Methods*. 77, 191-197.

Schmitt, P., et al., 2013. Sequence polymorphism and expression variability of *Crassostrea gigas* immune related genes discriminate two oyster lines contrasted in term of resistance to summer mortalities. *Plos One*. 8, e75900.

Vallenet, D., et al., 2009. MicroScope: a platform for microbial genome annotation and comparative genomics. *Database (Oxford)*. 2009, bap021.