



Défi MOREST

**Mortalités estivales de l'huître creuse
Crassostrea gigas.**

**Caractérisation des facteurs de risques
associés aux mortalités estivales**

Synthèse du thème 5

Risque associé aux pathogènes

(La Rochelle 14-15 mars 2006)

Projet cofinancé par :





Caractérisation des facteurs de risques associés au mortalités estivales

Synthèse du thème 5

Risque associé aux pathogènes

2001 - 2005

**J. L. Nicolas, T. Renault, B. Gagnaire, C. Garcia, F. Le Roux,
L. Miossec, J.-F. Pepin, D. Saulnier**

Contributeurs : I. Arzul, V. Barbosa-Solomieu, B. Chollet, N. Faury, B. Gagnaire, C. Garcia, M. Garnier, M. Gay, A. Goubet, Y. Labreuche, Le Roux F., L. Miossec, J.- L. Nicolas, J.-F. Pepin, T. Renault, M. Robert, D. Saulnier

Coordinateur du programme

J.F. Samain



1. Introduction	3
2. Rechercher et identifier des candidats potentiels.....	5
2.1. Synergie REPAMO-MOREST : les mortalités anormales d'huîtres creuses <i>Crassostrea gigas</i> entre 2001 et 2005.....	5
2.1.1. Objectifs et missions du réseau REPAMO.....	5
2.1.2. Les mortalités anormales	5
2.1.3. OsHV-1 et mortalités anormales de naissain.....	7
2.1.4. <i>Vibrio</i> sp. et mortalités anormales d'huîtres creuses	8
2.2. Bactéries du genre <i>Vibrio</i> rencontrées chez les huîtres au cours des mortalités (2001-2004) en écloserie et sur parcs	10
2.3. Caractérisation taxonomique d'isolats bactériens	12
2.3.1. Caractérisation de souches appartenant à l'espèce <i>Vibrio aestuarianus</i>	12
2.3.2. Caractérisation de souches associées au groupe des <i>Vibrio splendidus</i>	13
2.4. Développement d'outils de diagnostic spécifiques.....	15
2.4.1. Outils moléculaires pour détecter des bactéries appartenant au genre <i>Vibrio</i>	15
2.4.2. Anticorps polyclonaux et monoclonaux spécifiques du virus OsHV-1	16
3. Pouvoir pathogène et conditions d'expression de l'infection	16
3.1 <i>Bactéries et reproduction des mortalités au laboratoire</i>	16
3.1.1 Caractérisation du pouvoir pathogène d'isolats bactériens.....	16
3.1.2 Description des lésions induites par l'injection de bactéries : vers le développement de modèles	18
3.1.3 Modèle d'infection bactérienne : définition des conditions de transmission.....	19
3.1.4 Pesticides et infection bactérienne : une interaction possible !.....	21
3.1.5 Approche de mutagénèse chez les souches apparentées à <i>V. splendidus</i>	23
3.2 Virus OsHV-1, infection et transmission.....	24
3.2.1 Analyses des productions MOREST (larves et naissain) : détection du virus OsHV-1 et reproduction de mortalité.....	24
3.2.2 Transmission verticale du virus OsHV-1	24
4 Agents pathogènes et virulence.....	25
4.1 Recherche de gènes support de la virulence chez les bactéries.....	25
4.1.1 Chez les souches appartenant à l'espèce <i>Vibrio aestuarianus</i>	25
4.1.2 Chez les souches appartenant au groupe des <i>Vibrio splendidus</i>	27
5 Agents pathogènes et définition d'un risque	30
5.1 Variation temporelle de la flore <i>Vibrionaceae</i> dans le milieu marin et l'huître	30
5.1.1 Expérience Top-Flop	30
5.1.2 Expérience DYNAMOR	31
5.1.3 Marennes Oléron 2004.....	32
5.2 Ecologie de <i>Vibrio aestuarianus</i>	33
5.3 Suivi en milieu confiné des mortalités d'animaux élevés sur estran	34
6 Conclusion.....	36



1. Introduction

L'un des objectifs principaux des travaux en pathologie des mollusques est d'identifier et d'étudier des agents infectieux capables d'induire des maladies et des mortalités chez les coquillages, en particulier, chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, espèce principalement exploitée en France. Ces travaux semblent d'autant plus indispensables qu'il n'existait pas, jusqu'à ces dernières années, de maladies identifiées chez l'huître creuse en Europe excepté le virus herpès suspecté dès 1995 de provoquer des mortalités de naissain (Renault et al, 1995). Les principales maladies des espèces proches sont dues à des parasites comme *Haplosporidium nelsoni* (Ford et Heskin, 1987) et *Perkinsus marinus* Olivier et al, 1998) pour *Crassostrea virginica*, *Marteilia sydneyi*, et *Mikrocytos roughleyi* pour *Saccostrea commercialis* (Hine, 1996) ou à des virus (irridovirus pour *C. . angulata*) mais ils n'ont pas été détectés chez *C. gigas*. La maladie pouvant se rapprocher des mortalités estivales est la JOD (Juvenile Oyster Disease) sur *C. virginica* dans laquelle les conditions environnementales jouent un rôle majeur mais où l'agent causal est encore controversé (Ford et Borrero, 2001 ; Boettcher et al, 2000).

Par ailleurs si certaines bactéries provoquent des maladies elles n'entrent pas directement dans l'organisme mais attaquent les tissus sur leur partie externe montrant ainsi une certaine résistance des bivalves aux bactéries (Dungan et Elston, 1988 ; Elston et al 1999, Elston 1993, Paillard et al, 2004).. Avant que le programme MOREST ne démarre les mortalités estivales avaient été reliées quelques fois à des pathologies bactériennes mais les cas étudiés restaient limités. Les bactéries impliquées étaient soit *Nocardia crassostrea*. (Friedman et al, 1991) soit des *Vibrio* spp (Lipp et al. 1971 ; Lacoste et al, 2001 ; Waechter et al, 2002).

Aujourd'hui, si aucun agent pathogène particulier ne semble être associé de manière systématique aux épisodes de mortalités estivales au cours des dernières années chez les huîtres creuses, des bactéries du genre *Vibrio* ainsi qu'un herpèsvirus (Ostreid Herpesvirus type 1 ou OsHV-1) sont à l'origine de certaines mortalités ou les amplifient. Ces observations laissent penser que les mortalités estivales ne correspondent pas à une épizootie faisant intervenir un agent infectieux unique. Cependant, différents agents pathogènes apparaissent associés à ce phénomène et doivent donc faire l'objet d'études plus approfondies.

En terme de pathologie, deux questions majeures ont été posées et ont fait l'objet de travaux au cours du projet MOREST. Ces questions sont les suivantes :

- Des agents infectieux sont-ils impliqués dans les phénomènes de mortalités estivales ?

- Certaines conditions (environnement, animal, interactions entre micro-organismes) peuvent-elles favoriser l'apparition et le développement de maladies infectieuses aboutissant à des mortalités chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas* ? Pour tenter de trouver des réponses à ces questions, une démarche classique développée en pathologie a été utilisée. Elle a consisté à :

1. - Rechercher et identifier des candidats potentiels ;

2. - Démontrer que les candidats identifiés possèdent un pouvoir infectieux et étudier s'ils ont besoin de conditions particulières pour induire une maladie ;

3. - Caractériser les mécanismes par lequel un agent est capable d'induire une maladie et des mortalités (virulence) ;

4. - Tenter de maîtriser les maladies infectieuses en définissant un risque.

Il apparaît particulièrement important pour l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, espèce essentiellement élevée sur l'estran, d'étudier les maladies infectieuses à la lumière des interactions qui peuvent exister entre les trois compartiments que sont l'animal (hôte), l'environnement et les agents pathogènes (Figure 1)... En particulier les reproductions expérimentales des infections devaient ou auraient dû tenir compte des facteurs qui sont considérés comme essentiels que sont la température, le sédiment et la période de maturation (Beattie et al, 1981). Cependant le confinement est intervenu comme un facteur aggravant difficile à éviter de même que l'influence du sédiment était quasiment impossible à reproduire. L'étude intrinsèque des pathogènes a permis toutefois de faire avancer les connaissances d'une façon très significative sur l'épidémiologie, la taxonomie, les facteurs de virulence et la pathogénie.

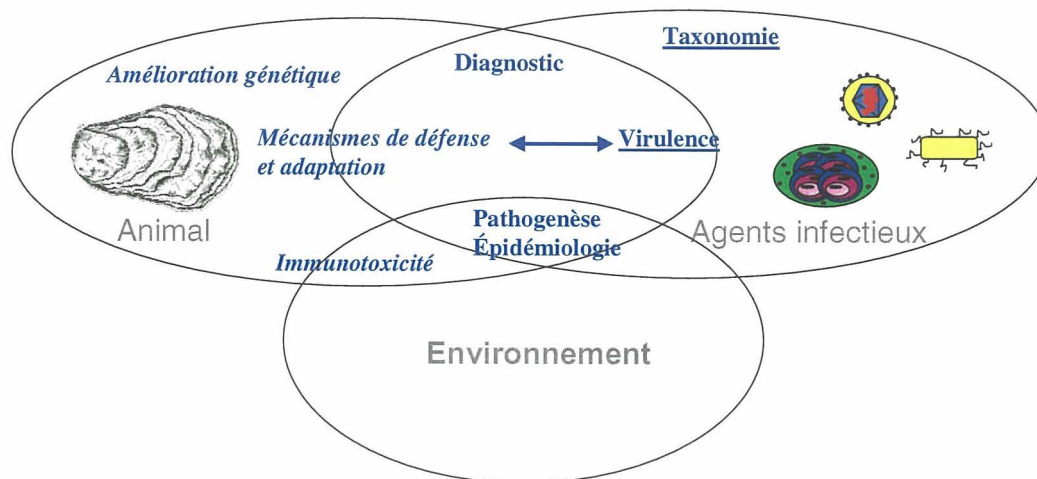


Figure 1 : Interactions Animal/Agent infectieux/Environnement (quelques mots clés)



2. Rechercher et identifier des candidats potentiels

Les pertes liées aux maladies sont un des principaux facteurs limitant le développement de l'aquaculture au niveau mondial. Le problème est d'autant plus critique pour les mollusques en raison de l'absence de moyens thérapeutiques, contrairement aux poissons. L'augmentation incessante des échanges entre les différents pays favorise également les risques d'introduction et de propagation d'agents pathogènes exotiques. (Paillard et al, 2004)

Peu de méthodes sont disponibles pour protéger les mollusques vis à vis des maladies en raison de leurs caractéristiques biologiques et des techniques d'élevages utilisées. Il apparaît donc essentiel, pour garantir le maintien des productions conchylicoles, de prévenir l'introduction d'animaux infectés et de détecter rapidement un nouvel agent afin de limiter sa propagation. Cette approche repose essentiellement sur le suivi de l'état de santé des cheptels conchylicoles. Les issues possibles lorsque la maladie est introduite reposent sur des modifications de la zootechnie ou sur la sélection de populations présentant une certaine tolérance ou résistance aux maladies susceptibles de les affecter.

2.1. Synergie REPAMO-MOREST : les mortalités anormales d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* entre 2001 et 2005

2.1.1. Objectifs et missions du réseau REPAMO

Créé en 1992, le réseau REPAMO (REseau de PAtologie des MOllusques) est un réseau de surveillance de la santé des mollusques marins du littoral français (gisements naturels ou élevage) ayant pour objectif de prévenir l'introduction et la propagation d'agents pathogènes, en particulier ceux à déclaration obligatoire et de surveiller l'évolution de ceux déjà présents sur le territoire national. Son activité s'inscrit dans le cadre de deux Directives Européennes, les Directives 91/67/CEE et 95/70/CE.

La surveillance assurée par le réseau REPAMO peut se décliner en trois principaux thèmes :

- Surveillance des maladies à déclaration obligatoire officiellement présentes en France : la bonamiose due à *Bonamia ostreae* et la martelliose due à *Marteilia refringens*
- Surveillance zoosanitaire des populations élevées et sauvages de mollusques. Ce suivi permet de recenser les agents pathogènes naturellement présents en France, de suivre leur évolution et d'évaluer leur impact réel ; il peut également permettre de détecter l'apparition d'une nouvelle maladie et de limiter son extension.
- Etude des cas de mortalités anormales

2.1.2. Les mortalités anormales

- Définition

Les mortalités anormales de mollusques tant sur les concessions en mer (estran, eaux profondes), en écloséries et nurseries, en bassins à terre et claires, qu'au niveau des gisements naturels exploités doivent faire l'objet de déclaration aux Affaires Maritimes. La réglementation (article 2 de la Directive Européenne 95/70/CE) les définit en élevage et sur des gisements naturels comme toutes mortalités subites affectant plus de 15 % d'un stock dans un intervalle maximal de 15 jours. En éclosérie, elles sont définies comme des mortalités telles que l'écloqueur ne peut obtenir de larves pendant une période supérieure à un mois et couvrant les pontes successives de plusieurs reproducteurs. En nurserie, elles se définissent comme des mortalités soudaines et importantes. En pratique, tout cas de mortalité considéré comme anormal par le professionnel doit être déclaré auprès des Affaires Maritimes, quelle que soit la cause suspectée.

L'étude des mortalités anormales dans le cadre du réseau REPAMO correspond donc à une surveillance passive ayant pour but premier d'écarter ou de confirmer une hypothèse infectieuse ; elle permet de relever la présence éventuelle d'agents pathogènes connus (ex : OsHV-1 et *Vibrio* sp.) ou nouveaux tout en reliant éventuellement ces résultats à des facteurs environnementaux et/ou à des pratiques culturales. Cette étude permet également de donner une typologie des mortalités anormales de mollusques sur le long terme.

- Bilan des mortalités anormales d'huîtres creuses entre 2001 et 2005

Entre 2001 et 2005, 93 évènements de mortalités d'huîtres creuses ont été déclarés (soit 201 lots analysés). Sur ces 93 évènements mortalités, 61 concernaient le naissain d'huîtres creuses (soit 144 lots de naissain analysés). L'année 2001 était une année où le nombre de déclaration de mortalité a été le plus important comparé aux années ultérieures (Figure 2).

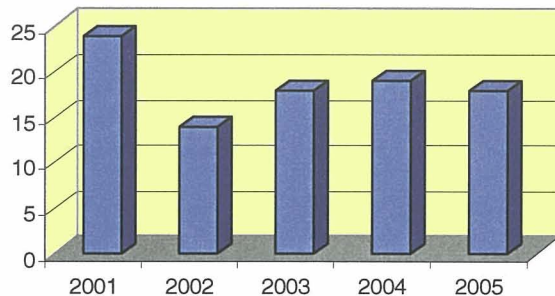


Figure 2 : Evènements mortalités d'huîtres creuses entre 2001 et 2005

Au cours de ces années, les mortalités ont affecté principalement le naissain en période estivale contrairement aux adultes qui sont généralement affectés tout le long de l'année (Figure 3). Cette saisonnalité dans les mortalités est retrouvée depuis une dizaine d'année. D'une manière générale, le nombre de déclaration de mortalité concernant le naissain est plus important que celui des adultes, excepté en 2003 où la tendance est inversée ; il est à noter que l'année 2003 était une année particulière en raison de la période de canicule estivale. Aucun bassin de production de l'huître creuse n'a été épargné par les mortalités estivales.

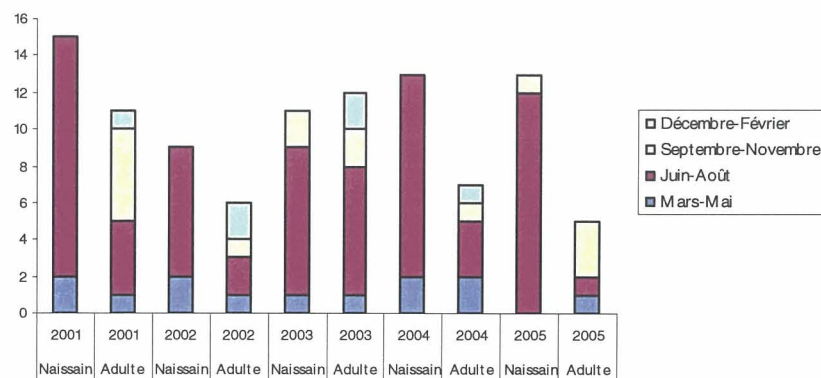


Figure 3 : Répartition des évènements mortalité d'huîtres creuses en fonction des saisons et des classes d'âge

Lors de déclaration de mortalités anormales, les analyses effectuées sont :

- l'histologie : technique de référence en pathologie des mollusques et recommandée par l'OIE. Cette technique permet d'observer la plupart des agents pathogènes de mollusques exceptés les virus (seules des lésions virales peuvent être observées)
- la recherche d'OsHV-1 par PCR uniquement réalisée sur le naissain
- la bactériologie, mise en place de manière systématique dans le cadre du réseau Repamo à partir de 2003

Au cours de la période 2001-2005, différents agents pathogènes ont pu être détectés lors des mortalités anormales de naissain d'huîtres creuses en particulier le virus OsHV-1 et des bactéries appartenant au genre *Vibrio*.

Ainsi, en 2005, 18 évènements de mortalités d'huîtres creuses ont fait l'objet de déclaration soit 23 lots analysés. Sur les 18 évènements mortalités, 13 concernaient le naissain soit 17 lots analysés. Ces mortalités ont principalement affecté le naissain en période estivale alors que les adultes ont été affectés tout le long de l'année. Ces mortalités ont touché la plupart des bassins de production mais



plus particulièrement la Charente Maritime, la Bretagne et la Vendée. Peu de mortalités ont été déclarées en Méditerranée et dans le bassin d'Arcachon. Le virus OsHV-1 a été détecté par PCR dans 8 événements de mortalités de naissain sur 13, soit 11 lots positifs sur 17 analysés. Des souches majoritaires du genre *Vibrio* ont été isolées chez du naissain de manière concomitante à la détection d'OsHV-1 dans un événement mortalité.

2.1.3. OsHV-1 et mortalités anormales de naissain

L'agent pathogène le plus fréquemment observé au cours des mortalités estivales de naissain est l'herpèsvirus de l'huître (55 lots positifs sur 136 analysés). Il a été essentiellement détecté entre les mois de mai et août et plus particulièrement pendant le mois de juin (30 lots positifs sur les 55 positifs) (Figure 4). Le mois de juin correspond généralement à une augmentation de la température de l'eau

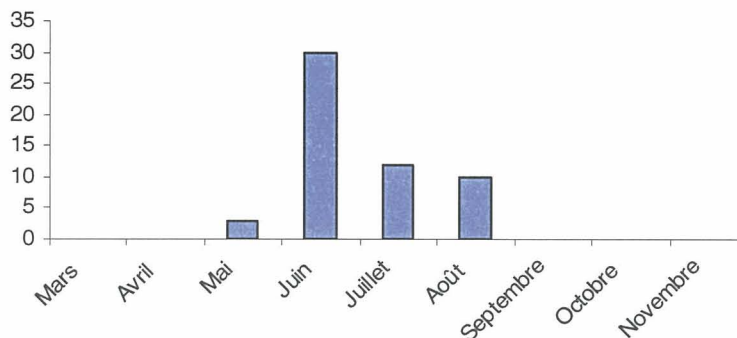


Figure 4 : Détection d'OsHV-1 entre 2001 et 2005

et cette augmentation pourrait entraîner un stress des huîtres et favoriserait l'expression d'OsHV-1.

OsHV-1 a été détecté dans la plupart des bassins de production d'huîtres creuses (de la Méditerranée à la Normandie) ; il est généralement détecté d'abord en Méditerranée vers mai-juin, puis sur la côte atlantique en juin-juillet et enfin en Manche en juillet-août (Figure 5).

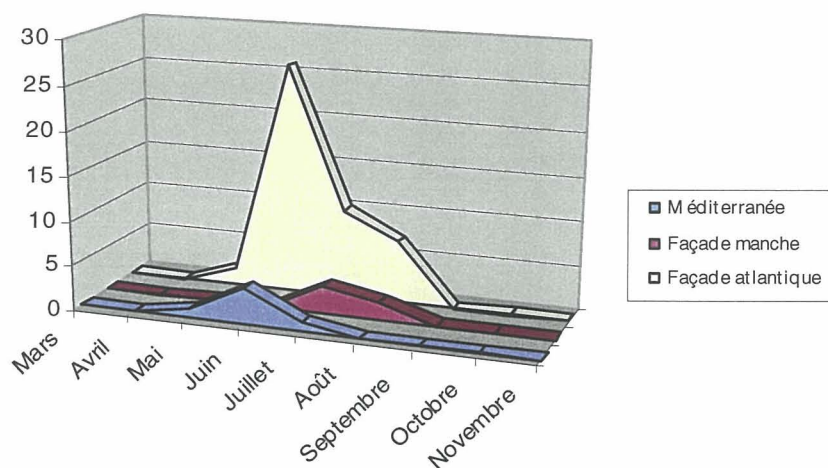


Figure 5 : Evolution de la détection d'OsHV-1 selon les façades littorales françaises

La détection du virus (par la technique de PCR) semble liée à l'augmentation progressive des températures (du sud vers le nord) et se superpose à l'apparition des mortalités de naissain (Figure 6).

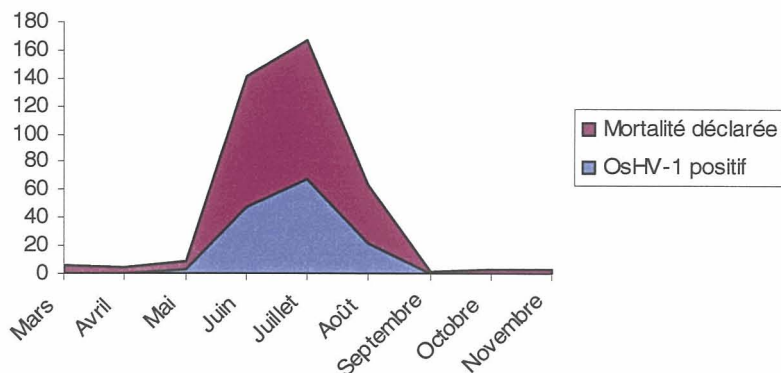


Figure 6 : Détection d'OsHV-1 et mortalité déclarée de naissain entre 2001 et 2005

La fréquence de détection d'OsHV-1 lors de mortalités de naissain est en moyenne de l'ordre de 40 à 60% depuis 2003 alors qu'elle était inférieure à 30% précédemment (Figure 7). Cette augmentation de fréquence de détection peut s'expliquer en partie par la restructuration interne du réseau REPAMO en 2002 (en particulier par la mise en place de correspondants côtiers tout le long du littoral). Etant directement sur le terrain, ils peuvent intervenir plus rapidement lors d'évènements mortalités déclarés et réduire ainsi les délais entre prélèvement et mortalité. En effet, le fait de disposer de prélèvements réalisés au plus près d'un épisode de mortalité augmente la probabilité de détecter des agents pathogènes fugaces tels que les virus (OsHV-1) et les bactéries (ces agents étant difficilement détectés une fois l'épisode de mortalité passé). A cela s'ajoute une meilleure réactivité des professionnels lors de mortalités anormales. Ils déclarent plus rapidement les mortalités qu'ils peuvent constater, le délai entre mortalité et prélèvement s'en trouvant ainsi réduit.

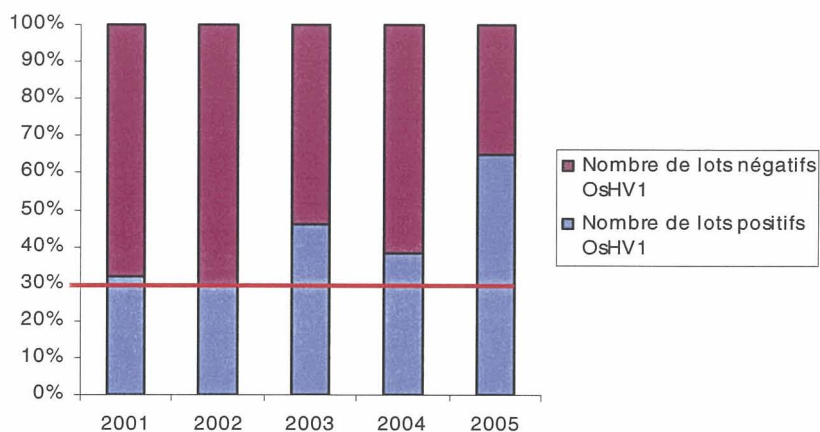


Figure 7 : Fréquence de détection d'OsHV-1 entre 2001 et 2005

L'optimisation des procédures d'échantillonnage a sans doute également contribué à augmenter la fréquence de détection d'OsHV-1. En effet, il est statistiquement prouvé que OsHV-1 est plus facilement détecté si le prélèvement contient des huîtres moribondes et s'il a été effectué moins d'une semaine après l'observation de la mortalité.

2.1.4. *Vibrio sp.* et mortalités anormales d'huîtres creuses



Dans le cadre du réseau REPAMO, la recherche systématique de bactéries potentiellement pathogènes a été mise en place à partir de 2003. Entre 2003 et 2005, 114 lots d'huîtres creuses ont ainsi été analysés dont 54 en bactériologie. Sur ces 54 lots, 31 concernaient du naissain et 23 des adultes. Sur les différents lots analysés, seules les bactéries apparaissant majoritaires sur les milieux de culture étaient isolées et conservées.

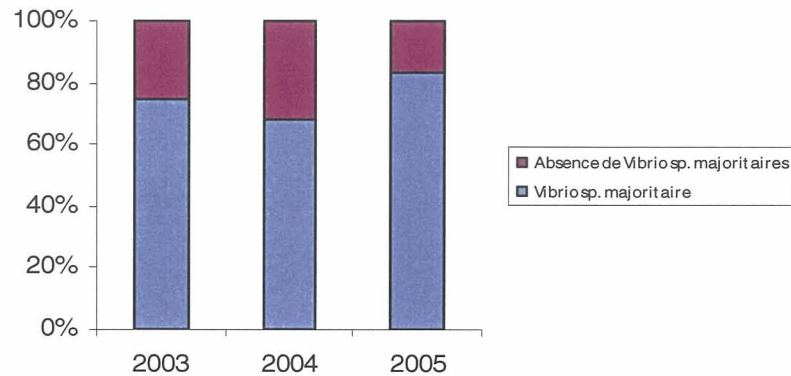


Figure 8 : Fréquence de détection de souches *Vibrio* sp. majoritaires

Des souches bactériennes majoritaires appartenant au genre *Vibrio* ont fréquemment été observées à la fois sur des adultes et sur du naissain d'huîtres creuses (Figures 8 et 9) entre 2003 et 2005 (39 lots positifs sur les 54 analysés).

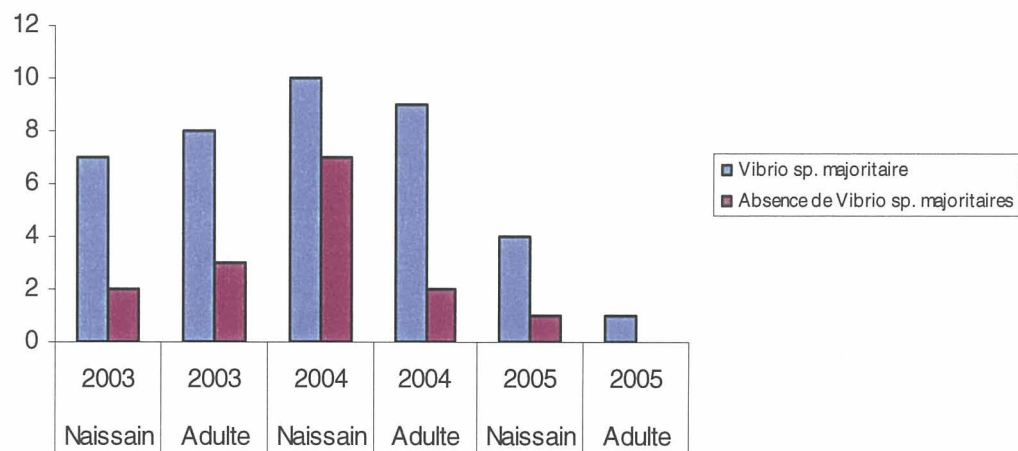


Figure 9 : Détection de souches *Vibrio* sp. majoritaires en fonction des classes d'âge

Les souches bactériennes isolées provenaient des principaux bassins de productions. Dans 60% des cas, elles ont été isolées lors d'épisodes de mortalités ayant eu lieu en structure fermée (écloserie, nurserie, bassin de stockage) ou en milieu fermé (claires ostréicoles, étang). Ces souches ont été détectées tout au long des années, mais plus particulièrement au printemps et en été (Figure 10). Il est à préciser qu'entre 2003 et 2005, pour les lots de naissain des mois de mai et juin, des souches majoritaires ont été isolées conjointement à une détection d'OshV-1.

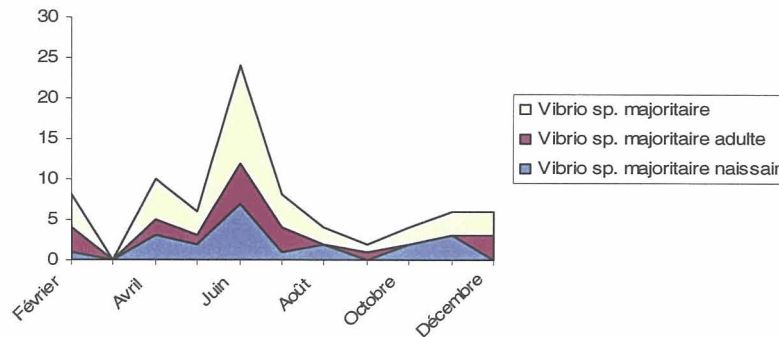


Figure 10 · Détection de souches *Vibrio* sp. majoritaires entre 2003 et 2005

Il n'est actuellement pas possible de conclure sur l'impact des différentes bactéries isolées lors d'épisodes de mortalités anormales dans le cadre de la surveillance exercée par le réseau REPAMO. Il faudra au préalable caractériser les différentes bactéries isolées afin de savoir s'il s'agit de souches différentes ou non détectées lors des épisodes de mortalité ; il faudra également s'intéresser à leur pouvoir pathogène et cela impliquera entre autre la réalisation d'infections expérimentales (*la caractérisation des différentes bactéries isolées est actuellement en cours*).

Dans le cadre du suivi des mortalités réalisé par le réseau REPAMO, des agents pathogènes ont été détectés lors de mortalités anormales ; certains ont pu être impliqués dans certains épisodes de mortalité anormale mais tous les cas de mortalité ne peuvent pas s'expliquer par la présence d'agents pathogènes. Des facteurs environnementaux (dessalure, phénomène météorologique...), zootechniques (forte densité, manipulation lors de la période de reproduction des coquillages...), physiologiques (maturation, faible croissance...) peuvent intervenir de manière directe ou indirecte dans les mortalités constatées et c'est fréquemment l'association de plusieurs de ces facteurs qui est à l'origine des mortalités.

2.2. Bactéries du genre *Vibrio* rencontrées chez les huîtres au cours des mortalités (2001-2004) en éclosierie et sur parcs

Ce travail a fait l'objet d'une publication (Garnier et al, 2006)

La plupart des huîtres analysées proviennent des lots expérimentaux du programme Morest sauf au cours de l'année 2001 où un certain nombre de lots de professionnels ont été analysés. Au moment d'événements de mortalité, les huîtres moribondes et saines ont été prélevées sur parcs ostréicoles, puis transportées, gardées au froid, sous 24h (parfois 48H) jusqu'au laboratoire. Pour les huîtres provenant d'éclosierie, seules des huîtres moribondes ont fait l'objet d'analyses. Elles ont été prélevées dans de meilleures conditions, juste au moment où se manifestait un affaiblissement de la tonicité musculaire.

Pour éviter de mélanger la microflore digestive normale de l'huître avec celle potentiellement pathogène infectant les tissus, seule l'hémolymphe a été prélevée (stérilement et par voie intramusculaire). Après une dilution au 1/10^{ème}. Cent µl d'hémolymphe ont été étalés sur un milieu nutritif Marine Agar (ou milieu de Zobell), puis incubés 5 jours à 20°C. Les colonies ont été comptées selon leur type morphologique observé macroscopiquement et de 3 à 10 isolats par morphotype ont été repiqués. Une première discrimination a été réalisée typage RFLP du gène codant une hélicase ou gyrase B. Pour chaque profil RFLP obtenu, le séquençage 16S d'au moins une souche bactérienne a été ensuite effectué pour une caractérisation taxonomique

Des huîtres saines peuvent contenir dans leur hémolymphe des bactéries à des concentrations modérées à élevées qui peuvent atteindre plus de 10⁵ ml⁻¹ pour un tiers d'entre elles (Tableau 1). Ces gammes de concentration bactérienne se retrouvent également chez les huîtres moribondes provenant de parc ou d'éclosierie-nursery, mais dans des proportions inverses de celles des huîtres saines avec seulement 8,3% d'huîtres modérément infectées (<10⁵ ml⁻¹).

Les analyses bactériologiques de ces huîtres moribondes prélevées lors de 16 cas de mortalités enregistrées sur parcs montrent qu'environ 40% des huîtres sont infectés par une seule espèce bactérienne, tandis que 40% sont infectés par plusieurs souches bactériennes d'espèces différentes : il s'agit notamment de *Vibrio aestuarianus*, d'espèces appartenant au groupe polyphylétique de *V. splendidus* et dans quelques cas de *Pseudoalteromonas* sp. Dans les 20% des cas restant les



bactéries sont peu ou modérément présentes ($<10^5 \text{ ml}^{-1}$). En éclosérie ou en nursery (12 événements analysés), toutes les huîtres mourantes présentent un nombre élevé de bactéries dans l'hémolymphe avec une seule espèce dominante, proche ou identique de celles trouvées sur les huîtres des parcs.

Il restera toujours une incertitude à propos des bactéries isolées d'huîtres moribondes prélevées car peu d'entre elles présentent des tissus intacts et la question se pose de savoir s'il s'agit de bactéries pionnières ou si elles ont supplanté secondairement les bactéries présentes à l'origine. Par ailleurs on est en droit de se demander si les bactéries isolées sont- représentatives de l'ensemble de celles qui contaminent les huîtres. Il est à remarquer en effet que les huîtres moribondes d'un même lot peuvent être infectées par des bactéries différentes. Par contre les mortalités spontanées en éclosérie-nursery ont toujours eu une cause infectieuse provoquée par un seul pathogène (virus ou bactérie) mises à part les mortalités imputables à des accidents zootechniques..

Tableau 1: Répartition des huîtres moribondes et saines selon le type de colonisation ou d'invasion bactérienne

Arc : Arcachon ; **Arg** : Argenton ; **Bou** : Bouin ; **BoV** : Baie des Veys; **Fou** : Fouras; : **MOB**: Bassin de Marennes Oléron; **Qib**: Quiberon; **GoM** : Golfe du Morbihan

	Septicémie à une souche dominante	Septicémie à plus de 5 souches	Bactériémie 10^5 - 10^6 mL^{-1} à une souche dominante	Bactériémie 10^5 - 10^6 mL^{-1} Avec plus de 5 souches	Concentration bactérienne $< 10^5 \text{ mL}^{-1}$
NbreSaines (S)	2 (Fou)	28 (Fou), 1(MOB)	1(GoM), 8(BoV)	2 (Arc), 3(GoM), 7(BoV); 6(MOB), 6 (Qib)	12 (Arc), 24(GoM), 57(BoV), 29(MOB), 6(Qib)
Nbre Moribondes (M)	25(Arg), 3(GoM), 8(BoV), 19(Bou), 1(MOB)	12 (Fou), 2(GoM), 5(MOB), 4(Bou), 1(BoV), 1(Qib), 1(Arc), 5 (Arg)	1(Fou), 2(BoV)	1(Arc), 4(BoV), 2(Qib), 3(GoM)	4(Arc), 1(GoM), 4(MOB)
Total SM	2/56	29/31	9/3	24/10	126/9
%Saines	1,1	15,3	4,7	12,6	66,3
%Moribondes	51,4	28,4	2,7	9,2	8,3

La Figure 11 synthétise les données obtenues au cours de MOREST en terme d'identification et montre que lorsqu'une seule bactérie est dominante, la bactérie *V. aestuarianus* est le plus fréquemment rencontrée.

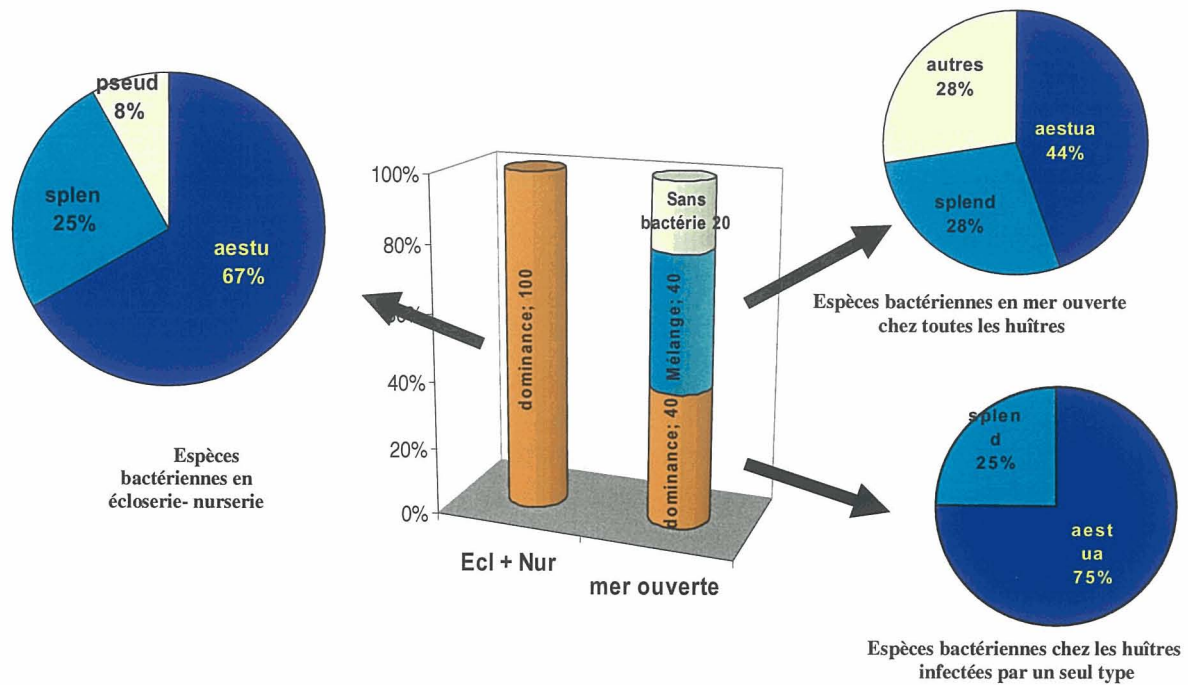


Figure 11 : Espèces bactériennes isolées et leur fréquence chez les huîtres moribondes collectées sur les parcs et en éclosionerie nursery au moment des événements de mortalité.

2.3. Caractérisation taxonomique d'isolats bactériens

L'étude du rôle des *Vibrios* dans les mortalités de *C. gigas* est confrontée à un problème majeur : leur identification en terme d'espèce. Dans la plupart des cas, les outils de classification des souches environnementales basés sur des tests biochimiques ne sont pas suffisants en raison de la variabilité et/ou versatilité des phénotypes des souches (McCarter, 1999) et du nombre important d'espèces nouvelles en cours de description. La taxonomie des espèces appartenant à ce genre doit être clarifiée par une approche polyphasique basée non seulement sur des critères phénotypiques mais également génétiques (Thompson et al, 2005). L'un des objectifs principaux en terme de pathologie est donc de développer des outils de diagnostic pertinents de *Vibrio* pathogènes.

2.3.1. Caractérisation de souches appartenant à l'espèce *Vibrio aestuarianus*

Douze souches de *Vibrio aestuarianus* isolées à forte concentration et en culture pure chez des huîtres moribondes ou quelques fois vivantes ont fait l'objet d'une étude taxonomique. Celles ci sont la particularité de présenter des degrés de virulence variables et une diversité phénotypique. Après analyse en taxonomie numérique (Sneath et Sokal, 1973) de leurs caractères phénotypiques il est toutefois possible de les regrouper en une seule entité taxonomique distincte des autres espèces de *Vibrio* excepté pour deux souches, dénommées 02/114 et 01/031, qui s'agrègent avec les espèces appartenant au groupe polyphylétique de *V. splendidus*.

Les études phylogénétiques effectuées à l'aide du logiciel de Galtier et al (1996) ont montré une forte similitude des séquences 16S et plus particulièrement des séquences *gyrB*, (Yamamoto et Harayama, (1995) entre elles (Figure 12) d'une part et d'autre part avec la souche de référence de *V. aestuarianus* (ATCC35048T). Des hybridations ADN-ADN ont été réalisées entre toutes ces souches ainsi que deux souches l'une provenant d'huître et l'autre étant la souche de référence ATCC35048T. Pour les souches provenant d'huître les taux d'hybridation sont supérieurs à 80% quelle que soit la souche considérée. La comparaison des taux d'hybridation ADN ADN obtenus avec la souche de référence de *V. aestuarianus* indique que sept souches présentent des hybridations inférieures à 65% tandis que 4 autres se situent entre 72 et 80%. Etant donné la similitude des séquences *gyrB* et 16S entre souches et l'obtention pour au moins quatre souches de taux d'hybridation supérieurs à 70%, ce qui constitue le critère de définition de l'espèce en systématique bactérienne, la délimitation d'une nouvelle espèce pour les sept souches restantes est impossible.

Le groupe de souches identifiées comme appartenant à l'espèce *V. aestuarianus* est très conservé d'un point de vue génétique. Ceci peut dénoter une capacité d'adaptation limitée et/ou une occupation de niche écologique restreinte de ces souches.

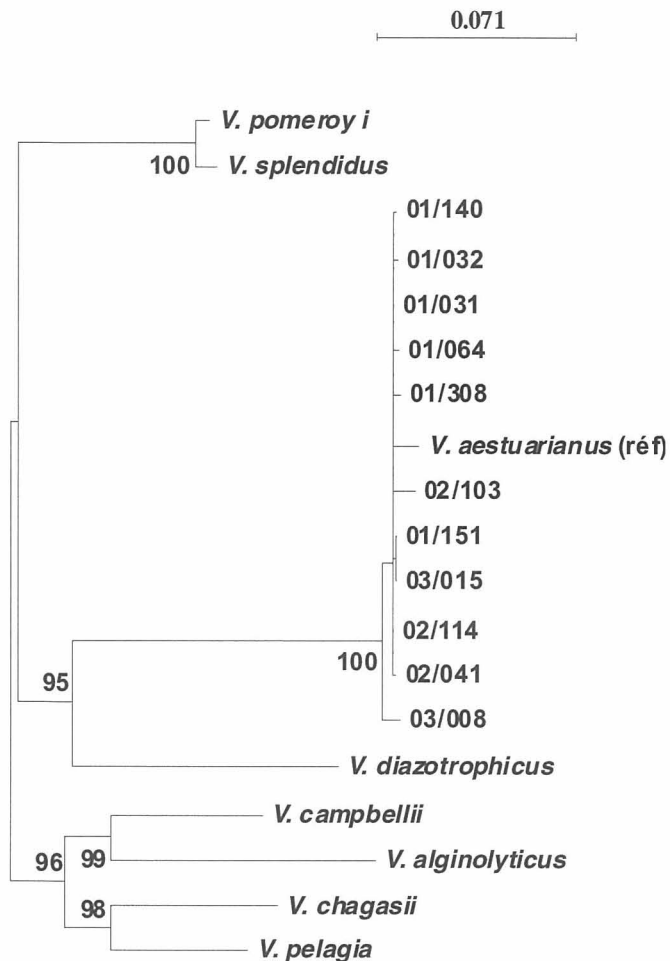


Figure 12 ; Arbre Phylogénique construit à partir des séquences GyrB des souches de *V. aestuarianus*

2.3.2. Caractérisation de souches associées au groupe des *Vibrio splendidus*

Au cours de l'été 2001, des animaux vivants voisins d'huîtres creuses subissant des mortalités estivales ont été placés en aquarium avec des animaux de l'écloserie de l'IFREMER (sain) pour des expériences de cohabitation. Dans neuf cas sur 12, des mortalités ont été observées laissant suspecter une origine infectieuse. Un isolement de la flore *Vibrionaceae* a été effectué à partir d'hémolymphe d'huîtres moribondes et d'huîtres saines. Cent vingt cinq souches de *Vibrio* ont ainsi été isolées.

Ces souches ont été caractérisées par une approche polyphasique : phylogénie moléculaire des gènes 16S, *gyrB*; hybridation ADN/ADN et phénotypage basé sur des tests biochimiques classiques. Cette étude a montré que la majorité des *Vibrio* isolés d'animaux sains ou malades partagent le même phénotype que *V. splendidus* (Figure 13a), mais appartiennent en fait à un groupe polyphylétique incluant les espèces *V. lentus*, *V. splendidus*, *V. chagasii*, *V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis* (Le Roux et al, 2004) et au moins deux nouvelles espèces décrites au laboratoire, *V. gigantis* et *V. crassostreae* (Faury et al, 2004 ; Le Roux et al. 2005). La taxonomie basée sur la phylogénie du gène *gyrB*, contrairement au gène 16S, est congruente avec les hybridations ADN-ADN (technique de référence en systématique bactérienne) L'étude de ce gène permet une meilleure discrimination que la phylogénie basée sur le gène 16S et donc une identification des souches apparentées à *Vibrio splendidus* (Figure 13b).

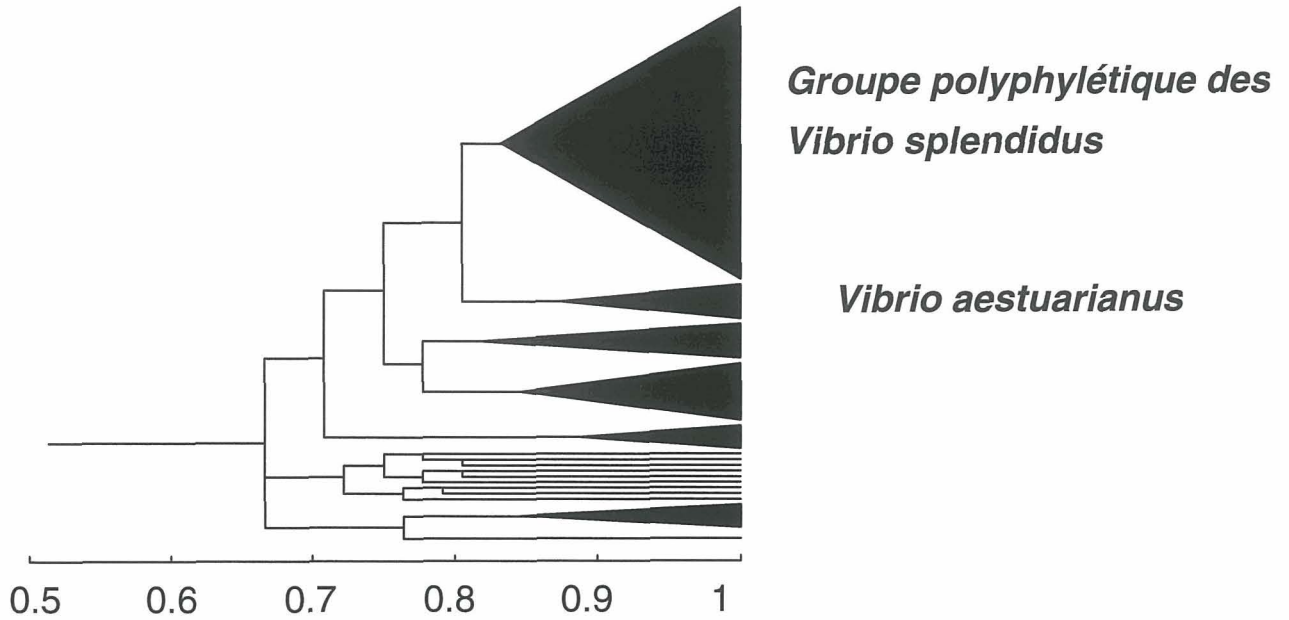


Figure 13a : Analyse par taxonomie numérique des profils phénotypiques des 125 souches isolées lors des expériences de cohabitation

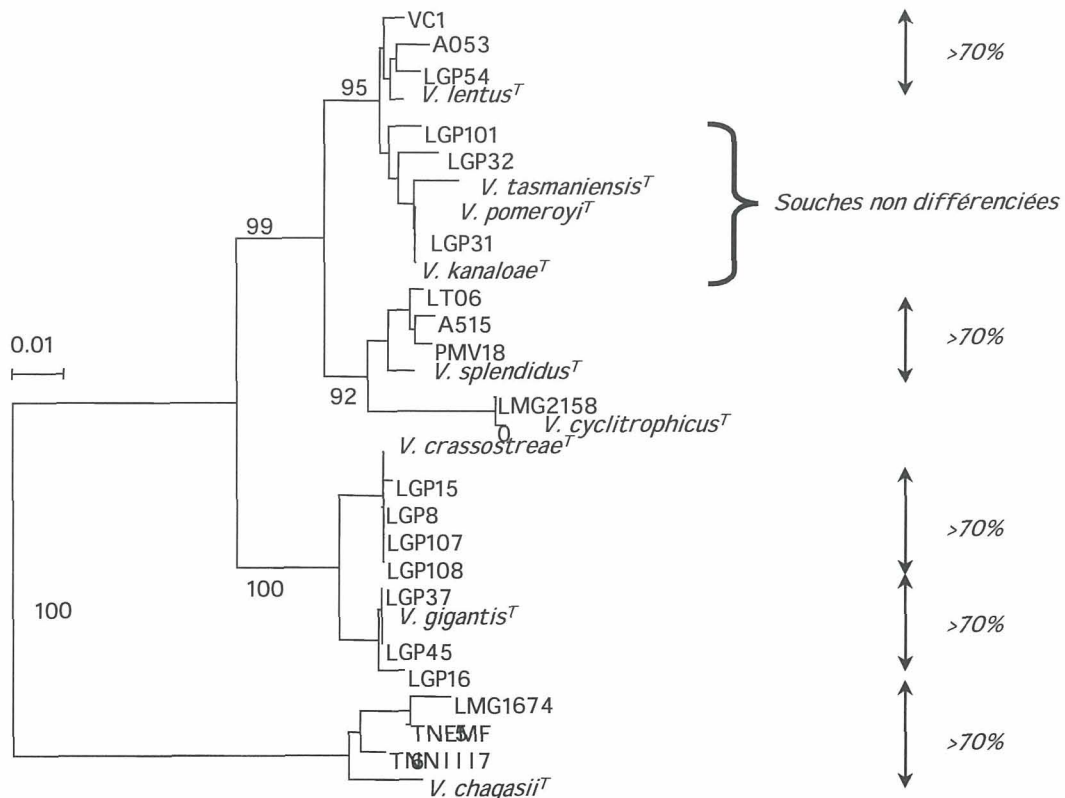


Figure 13b : Comparaison de la phylogénie sur le gène GyrB et des valeurs hybridations ADN ADN obtenues au sein de chaque cluster

La variété des souches de vibrions trouvées en dominance est tout à fait importante même s'ils sont principalement affiliés à *Vibrio aestuarianus* et au groupe *V. splendidus*. Leur pathogénicité par injection, par baignade ou par cohabitation a été démontrée. Cependant, la virulence des souches

est très variable même à l'intérieur d'une espèce homogène comme *V. aestuarianus*. Ces seuls faits amènent à penser qu'ils n'ont pas tous la même action : certains pourraient enclencher la maladie tandis que d'autres amplifieraient les mortalités enfin un certain nombre dépourvus de virulence seraient simplement les saprophytes possédant des capacités invasives pour coloniser les tissus des animaux.

2.4. Développement d'outils de diagnostic spécifiques

2.4.1. Outils moléculaires pour détecter des bactéries appartenant au genre *Vibrio*

Afin d'identifier les souches bactériennes incriminées de manière spécifique, des outils de détection des souches LGP31 ou LGP32 ont été mis au point. Pour cela une approche de génomique soustractive (SSH) a été initiée. Les fragments différentiels spécifiques de la souche LGP31 (ou de LGP32 (50/170 clones criblés) obtenus ont permis de générer par PCR des sondes froides marquées. Ces sondes ont été évaluées par hybridation de chacune des sondes avec l'ADN génomique des des 125 souches de la collection 2001 préalablement déposé sur une membranes, et ce, afin de sélectionner les sondes les plus spécifiques (Figure 14) Ce travail de génomique soustractive a été effectué en complément de l'approche de séquençage complet du génome de LGP32 en cours à l'Institut Pasteur dans le but d'identifier puis caractériser l'ensemble des gènes de virulence de ces souches.

ADN bactérien reconnu par la sonde

ADN bactérien non détecté par la sonde

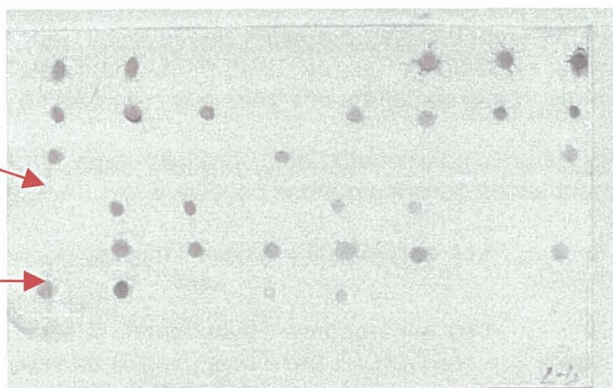


Figure 14: dot blot (membranes où a été déposé l'ADN génomique des 125 souches de la collection 2001) à l'aide d'une sonde issue des banques soustractives. Chaque sonde présente un profil de réactivité différent selon la souche bactérienne cible considérée

Ces sondes ont été également utilisées en hybridation *in situ* sur coupes histologiques d'huîtres infectées expérimentalement avec les souches LGP31 et LGP32. Du fait de la sensibilité du test, elles ont permis de localiser de façon spécifique (apparition d'une coloration bleutée) les bactéries LGP31 et LGP32 au pourtour du muscle, dans les gonades et dans la glande digestive (Figure 15).

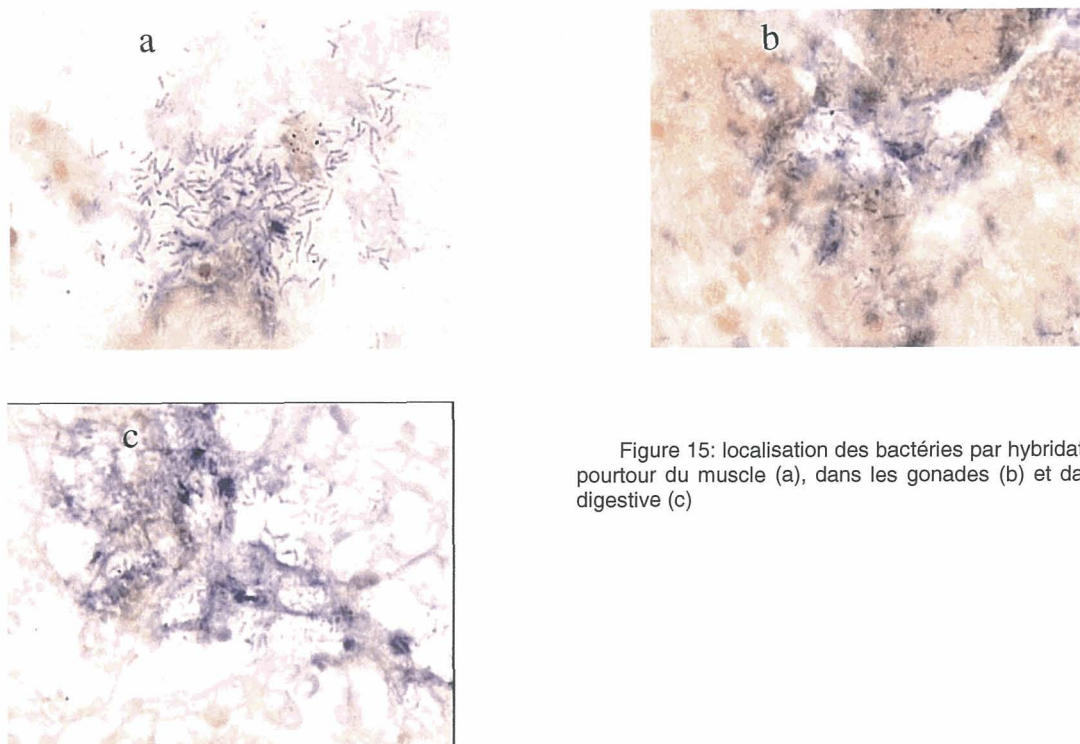


Figure 15: localisation des bactéries par hybridation *in situ* au pourtour du muscle (a), dans les gonades (b) et dans la glande digestive (c)



2.4.2. Anticorps polyclonaux et monoclonaux spécifiques du virus OsHV-1

Des outils moléculaires spécifiques de détection du virus OsHV-1 ont été développés suite à la purification du virus à partir de larves d'huître creuse infectées. Le matériel génétique du virus (ADN double brin) a été extrait à partir de particules purifiées et a servi à un travail de séquençage. Les données de séquence obtenues ont été utilisées pour développer des protocoles de PCR et d'hybridation *in situ* pour rechercher et détecter le virus de manière spécifique. La technique de PCR est en particulier utilisée en routine lors d'analyses pour des lots de coquillages présentant des mortalités anormales. Cependant, si des outils de type PCR ou hybridation *in situ* sont aujourd'hui disponibles et utilisés de manière courante, il n'en va pas de même pour des outils immunologiques. Ce type d'outil apparaît également important dans la recherche du virus : alors que les techniques de PCR et d'hybridation *in situ* permettent de cibler l'ADN viral, les anticorps spécifiques permettent de détecter des protéines virales.

Des anticorps « spécifiques » du virus avaient été produits dans le cadre du programme européen VINO en 2002. Des travaux ont été réalisés afin de préciser leur utilisation à des fins diagnostiques. Afin de qualifier ces anticorps déjà disponibles au laboratoire (produits par la société EUROGENTEC dans le cadre du projet européen VINO) et ceux produits en 2004 (Clean-cells et Covalab), deux séries de purification du virus OsHV-1 ont été réalisées pour obtenir un antigène relativement pur (extraction à partir de larves ou naissain positifs en PCR : détection d'ADN viral). Cet antigène a servi de base au coating des plaques pour le test des différents anticorps en ELISA. Les 22 clones disponibles ont été testés plusieurs fois avec différents protocoles. Un seul a été sélectionné, remis en culture et a servi à la production d'une ascite sur souris.

Les sérums polyclonaux lapin, produits dans le cadre du programme européen VINO, ont été également testés dans les mêmes conditions.

- 1- Les sérums polyclonaux lapin ne donnent pas de signal spécifique anti OsHV-1 en ELISA.
- 2- Les surnageants d'hybridomes et liquides d'ascites testés ne donnent pas de signal spécifique anti OsHV-1 significatif (hormis un seul, LG 5E5, très faible DO) en ELISA.
- 3- L'ascite produite en 2004 à partir de LG 5E5 ou les IgG purifiées de cette ascite, n'ont pas donné de signal spécifique significatif en ELISA.

Le LGP (IFREMER La Tremblade) ne dispose donc pas aujourd'hui d'anticorps spécifiques anti OsHV-1 exploitables en ELISA pour le développement d'un outil de diagnostic immunologique.

3. Pouvoir pathogène et conditions d'expression de l'infection

3.1 Bactéries et reproduction des mortalités au laboratoire

3.1.1 Caractérisation du pouvoir pathogène d'isolats bactériens

L'étude du rôle des *Vibrio* dans les mortalités de *C. gigas* est confrontée au problème majeur de la caractérisation de leur statut vis à vis de l'hôte (commensaux, opportunistes ou pathogènes). L'identification de certaines espèces potentiellement pathogènes (*V. splendidus*, *V. anguillarum*, *aestuarianus*) n'apporte aucune information sur le potentiel de virulence réelle des souches. En effet, pour un groupe de souches bactériennes génétiquement proche on constate, après épreuve d'infection expérimentale, la coexistence de souches virulentes avec des souches non pathogènes. L'infection expérimentale est par conséquent actuellement le seul moyen de définir le pouvoir pathogène des souches isolées. Cependant l'animal n'étant pas domestiqué, son état physiologique difficile à maîtriser des problèmes de reproductibilité sont fréquemment observés. L'un des objectifs principaux dans ce cadre de ce projet a donc été de développer dans un premier temps au moins un modèle d'infection reproductible par la sélection de souches bactériennes d'intérêt et l'évaluation de différents protocoles de reproduction d'infections bactériennes puis de décrire dans un deuxième temps la (les) maladie(s) associée(s) : pouvoir pathogène, influence des paramètres biotiques et

abiotiques. Plusieurs méthodes ont été testées : la baignade, la cohabitation entre des huîtres inoculées avec une bactérie pathogène ou infectées naturellement et l'injection intramusculaire

- Souches appartenant à l'espèce *Vibrio aestuarianus*

Les résultats d'infection sont peu reproductibles en baignade : variabilité inter-bacs d'une même condition et d'une expérience à l'autre bien que pour rendre plus sensibles les huîtres des stress de température (40°C pendant 2 H) aient été pratiqués. En injection intra-musculaire après avoir meulé la coquille pour atteindre le muscle, la veille de l'injection, les résultats sont plus reproductibles avec toutefois des réponses d'amplitude variable en terme de mortalité mais qui respectent en général le degré de virulence des souches.

Après injection intra-musculaire, aucune des souches trouvées en mélange ne sont pathogènes tandis que la plupart des souches isolées en culture pure ou en forte dominance le sont (Figure 16). Le degré de virulence des autres est malgré tout variable. Il ne semble pas que ce soit dû à des pertes de virulence au cours des subcultures ; ce phénomène n'a pas été observé sur les souches virulentes.

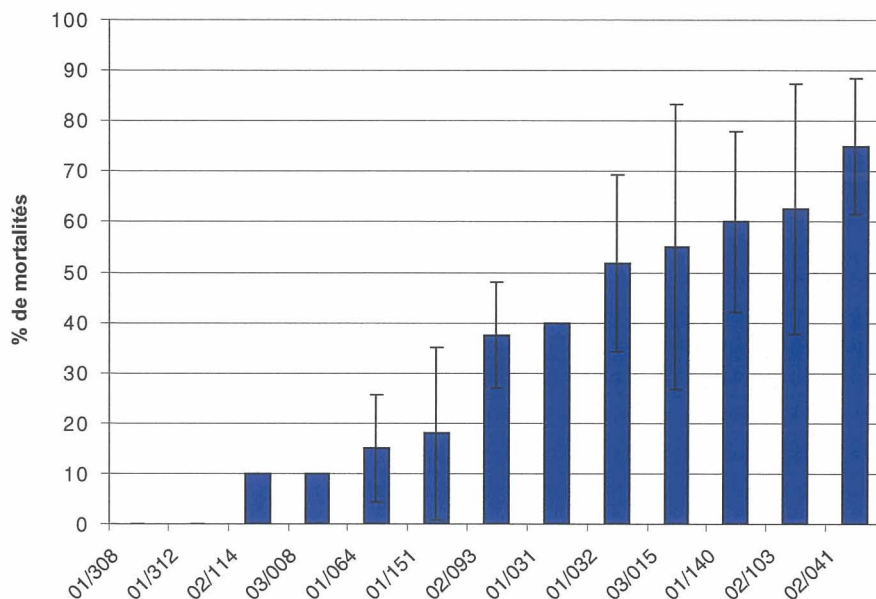


Figure 16 : Infection expérimentale d'huîtres par injection de différentes souches de *V. aestuarianus* isolées d'huîtres moribondes en culture pure ou à l'état dominant.

- Souches appartenant au groupe des *Vibrio splendidus*

En raison du grand nombre de souches à étudier, un premier criblage des souches virulentes a été effectué en regroupant par quatre des isolats d'une même expérience de cohabitation (Gay et al, 2004 ; Le Roux et al, 2002). Ces groupes de souches ont été injectés dans un premier temps dans le muscle adducteur de palourdes du fait de la plus grande sensibilité et reproductibilité de ce modèle expérimental aux infections bactériennes (Figure 17a) puis ensuite dans le muscle adducteur d'huîtres creuses (au total : 4.10^7 CFU). Seize souches (quatre groupes de quatre) sur 125 ont ainsi été sélectionnées pour un second criblage dans l'huître. Elles ont été classées en trois catégories selon le taux de mortalité cumulée obtenu au bout de trois jours : virulence faible (<10%, n=3), virulence moyenne (<30% ; n=12), virulence forte (>50% ; n=1).

Mortalités cumulées en %

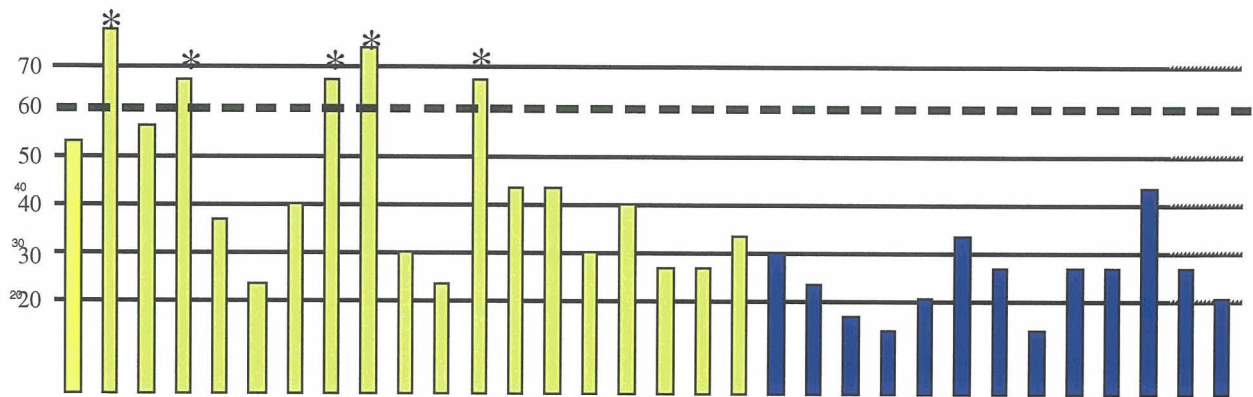


Figure 17 a : Criblage en infection expérimentale des 125 souches utilisées par pool de 4 chez la palourde. En jaune figurent les souches provenant des huîtres moribondes et en bleue les souches provenant des animaux sains. Les astérisques correspondent aux pools de souches dont la pathogénicité a été évaluée secondairement par injection intramusculaire d'huîtres *C. gigas*

% de mortalité 5 jours post infection

Curieusement, certaines souches injectées en couple (2.10^7 CFU+ 2.10^7 CFU) présentent une plus forte virulence (Figure 17b). Des études statistiques basées sur quatre expériences effectuées en triplicats ont été menées pour le couple LGP31 et LGP32 (Figure 17b) qui a été retenu comme modèle d'étude en raison de la reproductibilité des résultats obtenus. Ces deux souches appartiennent à un groupe d'espèces apparentées à *V. splendidus* comprenant les espèces *V. kanaloae*, *V. tasmaniensis* et *V. pomeroyi* qui demeurent actuellement indifférenciables les unes des autres du fait probablement de l'existence d'un continuum de souches. LGP32 et LGP31 entraînent toujours des mortalités de naissain quand elles sont injectées ensemble quel que soit l'état de l'hôte alors que leur virulence individuelle varie selon la sensibilité des huîtres. Des expériences d'injection en intra palléale ont confirmé l'effet pathogène de ces souches.

Mortalités cumulées en %

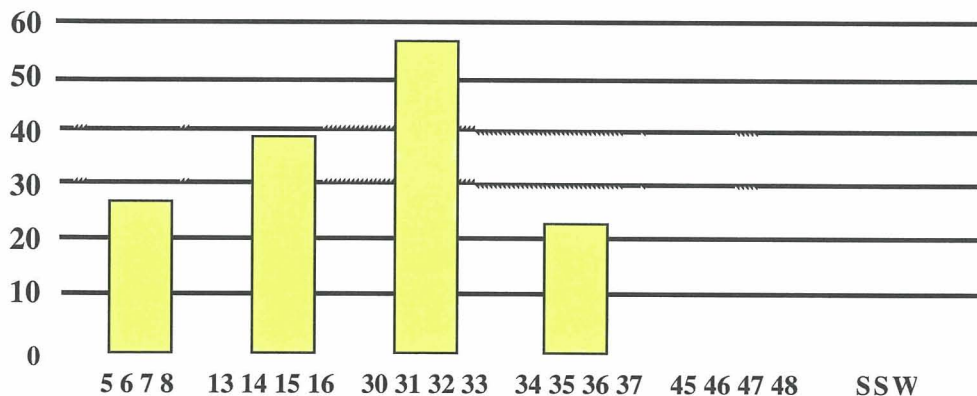


Figure 17 b : Criblage en infection expérimentale des pools de souches pathogènes pour les palourdes (plus de 60% de mortalité) par injection intramusculaire d'huîtres *C. gigas*. SS = contrôle négatif par injection intramusculaire d'eau de mer stérile

3.1.2 Description des lésions induites par l'injection de bactéries : vers le développement de modèles

Des études en histologie ont montré que dans les deux cas (injection intramusculaire ou intra palléale), les bactéries LGP31 et/ou LGP32 entraînent de fortes altérations des fibres musculaires et qu'elles sont localisées principalement au pourtour du muscle. Ce résultat a été confirmé en microscopie électronique (Figure 18).

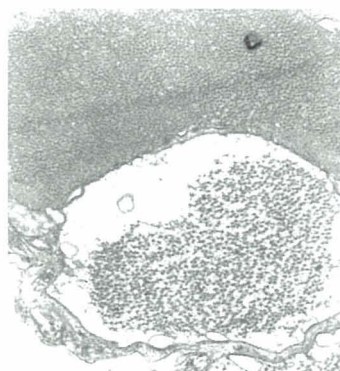


Figure 18 : Anomalie d'une fibre du muscle adducteur de *C. gigas*

3.1.3 Modèle d'infection bactérienne : définition des conditions de transmission

L'infection expérimentale est actuellement le seul moyen de définir le pouvoir pathogène des souches isolées. L'objectif principal est de décrire la (les) maladies associées à des bactéries appartenant au genre *Vibrio* : pouvoir pathogène, influence des paramètres biotiques et abiotiques.

Les différents essais (baignation avec des cultures de bactéries, jeûne puis baignation avec des co-cultures bactéries-algues alimentaires, cohabitation huître injectées-huîtres saines) ayant échoué, la nécessité d'un état physiologique particulier de l'huître et/ou d'un stress environnemental a été envisagé.

En 2003 des huîtres élevées à 15 ou 70 cm au dessus du sédiment ont été injectées avec des souches de vibrions virulentes (« donneuses ») et placées en cohabitation avec des huîtres non injectées de même origine (« receveuses »). Ainsi, des huîtres placées pendant quatre mois à 15 cm ou 70 cm du sédiment (atelier DYNAMOR), lavées et dégorgées ou non, ont été injectées avec les bactéries LGP31 et LGP32 et placées en cohabitation avec des mêmes lots d'huîtres non injectées. Des mortalités ont été observées de façon plus importante chez les huîtres élevées à 15 cm que chez les huîtres maintenues à 70 cm. Cette différence est moins nette si les huîtres sont lavées et dégorgées 24h. De plus, aucune mortalité n'est observée chez des huîtres lavées et maintenues en raceways plusieurs jours même avec addition de sédiment dans les aquariums. Ces résultats suggèrent un effet essentiel, mais non suffisant du sédiment. L'expérience a été réalisée tous les 15 jours de mi-mai à mi août, la transmissibilité est nulle en mai, forte en juin et juillet, moindre en août, suggérant fortement un effet de la maturation des huîtres. L'analyse cinétique de l'altération de l'hôte chez les animaux non injectés en histologie a permis de décrire les symptômes précédents la mort des individus : altération du muscle adducteur ; puis de la glande digestive et enfin des branchies.

En 2004, la reproductibilité de ces résultats a été évaluée et il a été tenté de déterminer si l'effet 15 cm agissait au niveau des donneuses et/ou des receveuses. En d'autres termes, si le fait d'élever des huîtres à proximité du sédiment augmentait la sensibilité de ces animaux (effet sur les receveuses) ou stimulait la virulence du pathogène (effet sur les donneuses). Malgré une année atypique (peu de phytobenthos oxydé dans le sédiment, températures globalement plus fraîches, très faibles mortalités sur ce site), un cas de transmission a été observé le 21 juillet (les mortalités en 2004 ont été réduites et sont survenues mi-juin), entre des huîtres donneuses élevées à 15 cm et des huîtres receveuses élevées à 15 ou 70 cm (Figure 19). Aucune transmission n'a été observée aux autres dates ou dans le cas d'huîtres donneuses élevées à 70 cm. Ces résultats laissent suggérer que l'état de ces animaux, en phase de pré-ponte, joue un rôle important dans la stimulation des vibrions, leur permettant alors de coloniser les animaux voisins non injectés.

Transmissibilité : un effet des receveuses ?

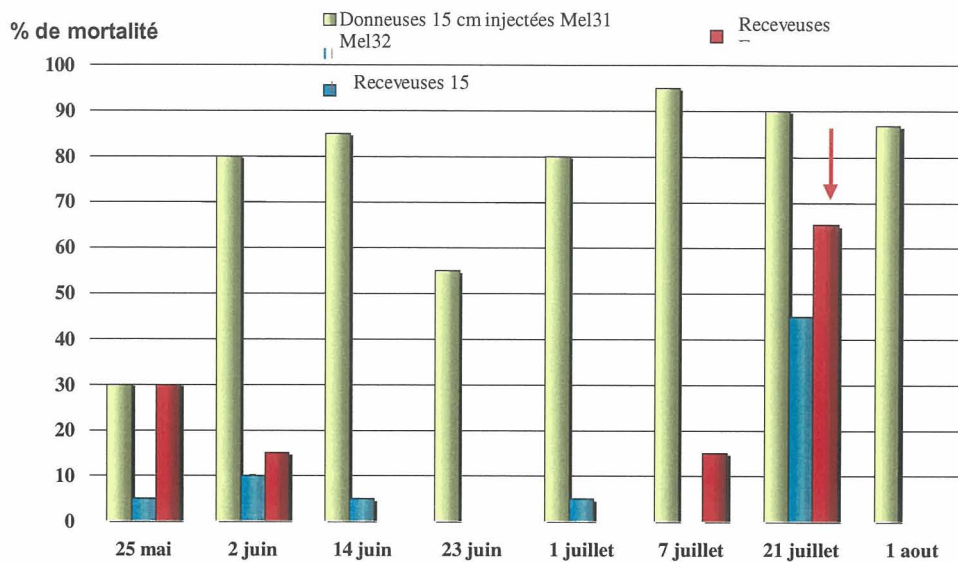


Figure 19 : Mortalité après cohabitation entre huîtres receveuses et donneuses (2003)

Par ailleurs, le rôle des gamètes dans la stimulation de vibrions a été analysé. Des gamètes mâles ou femelles ont été incubés en présence ou non de vibrions pendant 4 heures, le mélange a été ajouté aux huîtres en aquariums pendant 12h, les animaux ont été rincés et la viabilité des huîtres a été évaluée quotidiennement. Des numérations réalisées sur TCBS à partir d'eau des aquariums ont montré une amplification de la flore *Vibrionaceae* quelles que soient les conditions testées (+/- vibrions) témoignant du fait que les gonades utilisées étaient probablement déjà colonisées par des vibrions bien que l'on ne puisse exclure également la présence résiduelle de *Vibrio* dans l'eau de mer, même si celle-ci est filtrée. Pour étayer cette première hypothèse, des vibrions ont été mis en évidence au niveau de la gonade par hybridation *in situ* à l'aide de sondes spécifiques de LGP31 ou LGP 32 obtenues à partir des banques soustractives SSH (Figure 20).

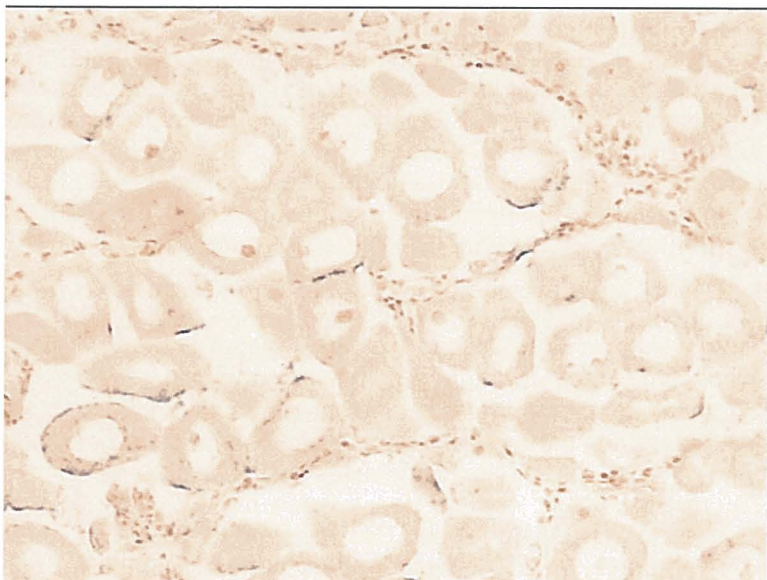


Figure 20 : Détection de la bactérie LGP32 chez une huître receveuse issue d'une expérimentation de cohabitation réalisée en 2003



Afin d'évaluer le rôle des gamètes sur la virulence des vibrions, il apparaît nécessaire d'éliminer la flore associée aux gamètes par un traitement antibiotique avant expérimentation et d'utiliser des souches génétiquement modifiées exprimant une résistance pour cet antibiotique.

3.1.4 Pesticides et infection bactérienne : une interaction possible !

Dans le cadre de MOREST, des expériences menées en 2003 à IFREMER Bouin ont permis de démontrer l'effet d'un mélange de huit pesticides à concentrations environnementales sur les paramètres hématocytaires d'huîtres « R » et « S » après un contact de sept jours. L'activité principalement diminuée était la phagocytose pour les deux types de familles (Figure 21 ; Tableau 2). Des expériences similaires ont été réalisées en 2004 à IFREMER La Tremblade pour tenter de reproduire cet effet. Trois expériences menées dans les mêmes conditions qu'à Bouin sur des « R » et des « S » ont permis de confirmer ce résultat. Un modèle permettant d'observer une réduction de l'activité de phagocytose en présence de polluants (mélange de huit pesticides) chez l'huître creuse (modèle d'immunotoxicité) est ainsi disponible.

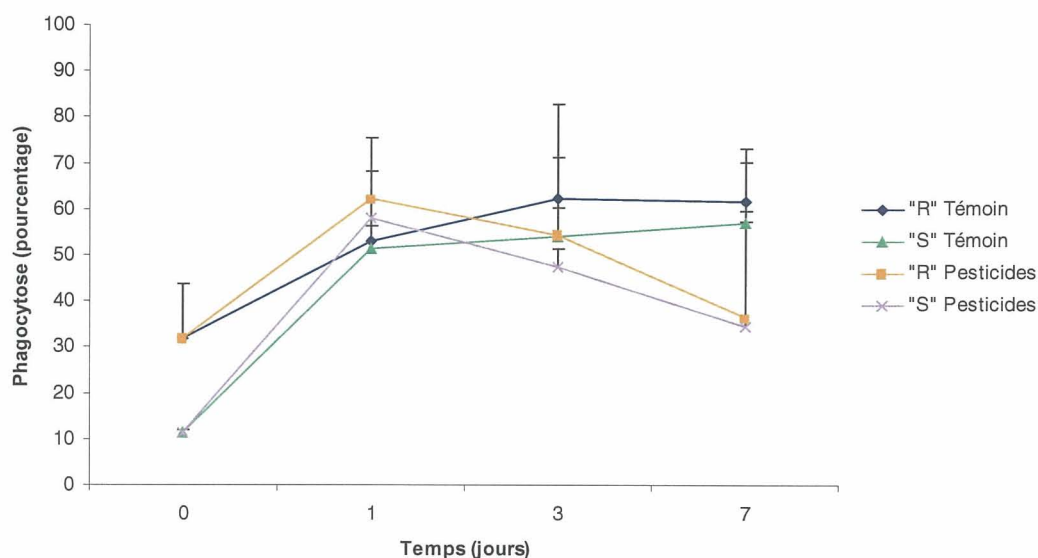


Figure 21 : évolution du pourcentage de phagocytose chez les familles « R » et « S » témoins ou contaminées par le mélange de pesticides lors de l'expérience à IFREMER Bouin en 2003

Tableau 2 : pourcentage de phagocytose lors des 3 expériences réalisées en 2004. * : p<0.05 ; ** : p<0.01. (T : Témoin ; P : Pesticides)

	Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3
R	T>P à 7 jrs *	T>P à 7 jrs *	T>P **
S		T>P *	T>P à 7 jrs *
ANOVA 2 facteurs	R>S à 7 jrs *	T>P *	T>P à 7 jrs ** *

Afin de déterminer un éventuel impact des pesticides sur la sensibilité aux maladies infectieuses, des essais d'infection avec des bactéries du genre *Vibrio* (LGP31 et LGP31) ont été réalisés. Il s'agit d'injecter un mélange de bactéries pathogènes à différentes concentrations après un contact de sept jours avec les pesticides afin d'observer l'effet des pesticides sur l'apparition et le développement d'une infection. Les expériences ont débuté par une contamination des huîtres avec un mélange de

huit pesticides (atrazine, diuron, alachlore, métolachlore, terbuthylazine, glyphosate, carbaryl, fosétyl aluminium). Après sept jours de contamination, les animaux ont été anesthésiés, puis injectés avec les souches LGP31 et LGP32. Deux concentrations de bactéries par individu ont été testées (2.10^7 et 4.10^7). Les mortalités des animaux ont été suivies et les ARN des hémocytes ont été extraits 24 h après l'injection afin de suivre l'expression de certains gènes suspectés d'être impliqués dans les mécanismes de défense en PCR temps réel. Les gènes sélectionnés étaient les suivants : isocitrate déshydrogénase (Idh), pro-cathepsine L (pro-CL), tissu inhibitor metalloproteinase (TIMP), superoxyde dismutase (SOD), lysozyme et défensine. Les expériences ont été réalisées sur des huîtres « R ».

Lors de l'injection de 2.10^7 bactéries par individu, la mortalité est significativement supérieure pour les huîtres témoins (T) et contaminées (P) injectées avec des bactéries par rapport à celles injectées avec de l'eau de mer (Figure 22a). L'analyse de variance montre que tous temps confondus, la mortalité des huîtres contaminées (P) est supérieure à celle des huîtres témoins (T) quelle que soit la nature de l'injection (EDMAS ou bactéries) ($p < 0.05$). Lors de l'injection de 4.10^7 bactéries par individu, la mortalité est significativement supérieure pour les huîtres témoins (T) et contaminées (P) injectées avec des bactéries par rapport à celles injectées avec de l'eau de mer (Figure 22b). Aucune différence de mortalité n'est rapportée entre les huîtres témoins et contaminées aux pesticides.

Les résultats rapportent ainsi qu'après une injection de 2.10^7 CFU.animal⁻¹, la mortalité des animaux contaminés aux pesticides était plus importante que celle des animaux témoins. Ce résultat n'a pas été retrouvé après injection de 4.10^7 CFU.animal⁻¹. Les pesticides semblent capables de modifier la sensibilité de l'hôte en termes de mortalité. Cette différence ne serait plus visible lorsque la dose de bactéries injectées est trop forte.

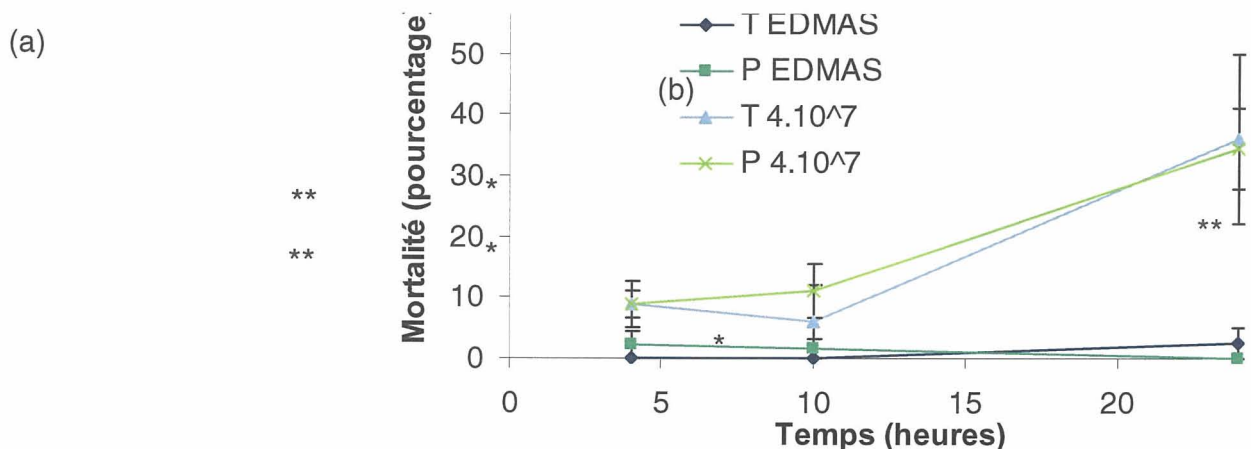


Figure 22: Pourcentages de mortalité obtenus lors d'expériences de contamination aux pesticides suivie d'une injection d'EDMAS ou de bactéries 31 + 32 à une concentration finale de (a) 2.10^7 bactéries par individu ou (b) 4.10^7 bactéries par individu. N = 2 réplicats. Les barres représentent l'erreur standard. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$.

(a) L'ANOVA a montré que tous temps confondus, la mortalité des huîtres contaminées (P) est supérieure à celle des huîtres témoins (T) ($p = 0.0119$, non représenté).

Lors de l'injection de 2.10^7 bactéries, les quantités relatives de transcrits de la proCL, de TIMP et du lysozyme étaient sur-exprimées chez les animaux contaminés en comparaison aux témoins (Figure 20). Lors de l'injection de 4.10^7 bactéries, les quantités relatives de transcrits de la proCL, de TIMP, de la SOD, du lysozyme et de la défensine étaient sur-exprimées chez les animaux contaminés en comparaison aux témoins (Figure 23).

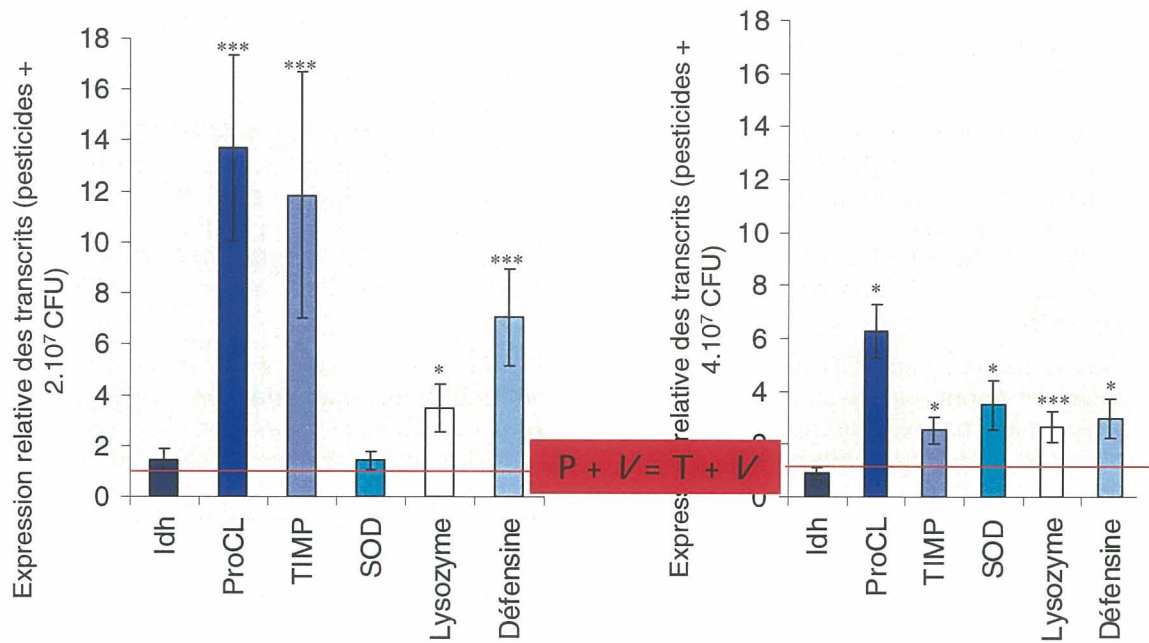


Figure 23 : Quantités relatives (QR) des transcrits des gènes dans les hémocytes des animaux exposés aux pesticides en comparaison aux huîtres témoins bactéries 24 h après injection de 2.10^7 bactéries (gauche) et 4.10^7 bactéries (droite). N = 3 réplicats ; l'erreur standard est représentée. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$. Le trait rouge correspond à une quantité de transcrits identique entre T + *Vibrio* et P + *Vibrio* (QR = 1).

Il ressort de ces résultats que les pesticides semblent favoriser l'expression de gènes tels que TIMP, la SOD, le lysozyme, la défensine et la procathepsine L. Des sur-expressions de certains de ces gènes dans le cadre d'une infection ont été rapportées dans la littérature. Une plus grande expression de ces gènes pourrait être interprétée comme une meilleure défense des animaux face à l'infection bactérienne après une contamination aux pesticides. Cependant, la forte expression de ces gènes lors d'infections a également été démontrée comme corrélée à des dommages à l'hôte, une sur-expression pouvant intervenir dans la pathogenèse et le développement des lésions.

3.1.5 Approche de mutagenèse chez les souches apparentées à *V. splendidus*

Des essais de conjugaison ont permis de transférer un plasmide répliatif d'une souche donneuse d'*E. coli* vers les souches LGP31, LGP32 et LMG20012 (vir-). Ce plasmide permet l'expression conditionnelle ou constitutive de la GFP et porte un gène de résistance au chloramphénicol. Ces souches fluorescentes facilement identifiables en épifluorescence (Figure 24) ou par un anticorps constituant d'ores et déjà un outil précieux pour l'histologie et la description de la pathogenèse. Des expériences de baignation avec des souches virulentes ou non en présence ou non de gamètes traités par du chloramphénicol pourront donc être réalisées.

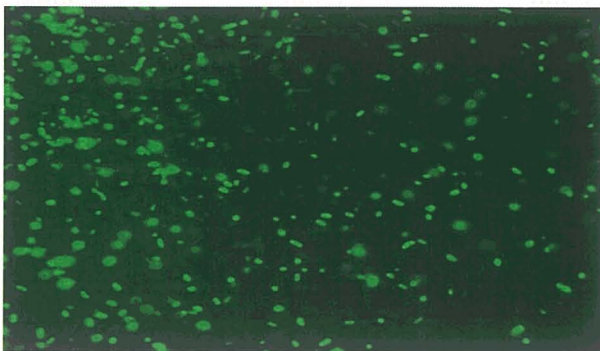


Figure 24 : Détection en épifluorescence de la bactérie LGP32 GFP

3.2 Virus OsHV-1, infection et transmission

3.2.1 Analyses des productions MOREST (larves et naissain) : détection du virus OsHV-1 et reproduction de mortalité

Des mortalités anormales ont été observées au cours des productions MOREST 2004 à l'écloserie de La Tremblade (IFREMER, Charente Maritime) aussi bien au stade larvaire qu'au stade naissain. Les analyses réalisées ont permis de mettre en évidence la présence d'OsHV-1 dans les larves et le naissain de micro nursery. Un échantillonnage et un suivi serré ont été menés sur l'ensemble des lots MOREST LGP produits entre avril et juin 04. Les lots suivis G4SD et G4F1 ont donné 7 bandes. Sur les 7, 6 ont présentés des mortalités très fortes associées à la détection du virus OsHV-1 par PCR.

Des larves positives en PCR (présence d'ADN viral) issues de ce suivi ont été utilisées comme matériel infectant et ont permis de confirmer le pouvoir pathogène du virus détecté par PCR (Figure 25). Ces reproductions expérimentales de la maladie avec des larves « axéniques » donnent une pertinence sur le suivi de cet agent pathogène et sur le modèle qu'il représente pour l'étude de la réponse immunitaire de *C. gigas*.

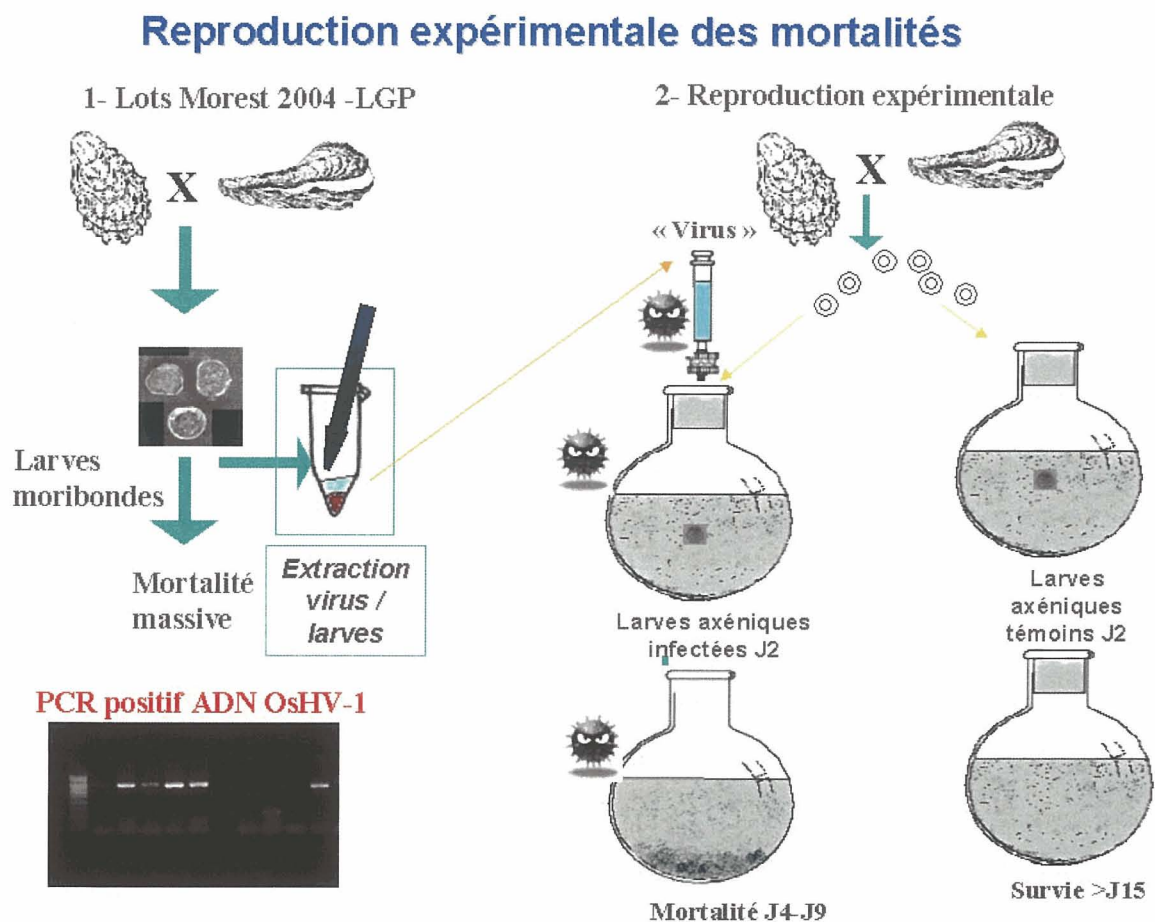


Figure 25: reproduction expérimentale de l'infection à virus OsHV-1 au stade larvaire chez *C. gigas*

3.2.2 Transmission verticale du virus OsHV-1

Dans le cadre de MOREST, une recherche d'ADN d'OsHV-1 a été réalisée en PCR dans trois générations successives d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, produites à l'écloserie de La Tremblade.



Les analyses réalisées au stade larvaire et chez des géniteurs ont permis de mettre en évidence la présence d'ADN viral de manière très précoce, dès deux jours après la fécondation. Ce résultat suggère très fortement l'existence d'une transmission verticale du virus. Par ailleurs, il a pu être montré que des géniteurs mâles positifs pour la détection d'ADN viral donnaient des élevages larvaires présentant des performances zootechniques bien inférieures à ceux provenant de géniteurs indemnes ou issus de femelles positives. Dans ces conditions, il pourrait être intéressant de screener les animaux avant les fécondations et d'éliminer les individus mâles positifs. Par ailleurs, il est possible de suspecter la transmission aux larves par les femelles porteuses du virus OsHV-1, de facteurs permettant de protéger la descendance vis à vis de l'infection virale.

Il a été proposé de définir le statut des géniteurs utilisés dans le cadre de MOREST quant à la présence de virus. Il est important de savoir si les huîtres utilisées sont infectées ou non pour la suite des événements. Les analyses ont été réalisées en PCR. Elles ont permis de qualifier les huîtres d'un point de vue pathologique. Les analyses ont porté également sur les élevages larvaires réalisés en 2003. Elles ont été réalisées en PCR pour rechercher l'ADN de virus de type herpes. Les analyses ont été effectuées sur des larves âgées de 10 jours et en cas de mortalité anormale.

Le virus OsHV-1 est détecté par PCR au stade larvaire pour les familles "R" et "S" avec cependant certaines différences en fonction des générations. La détection est comparable pour les G1 (21%) pour les familles « R » et « S ». Pour les G2 divergentes, une différence est observée entre "R" et "S" : 72,7% (8/11) des croisements de la lignée basse "S" sont positifs, alors que seulement 45,4% (4/11) des croisements de la lignée haute "R" sont positifs. Par ailleurs, le virus OsHV-1 est détecté par hybridation *in situ* chez les géniteurs G1 (0% à 43%) en fonction des familles considérées sans corrélation avec les taux de mortalité observés sur estran.

4 Agents pathogènes et virulence

4.1 Recherche de gènes support de la virulence chez les bactéries

4.1.1 Chez les souches appartenant à l'espèce *Vibrio aestuarianus*

- Etude du mode d'action de *V. aestuarianus* 01/32 chez l'huître

L'action des ECP (Extra Cellular Products) a été étudiée *in vitro* sur les hémocytes d'huître creuse. Ces ECP sont produits sur gélose nutritive (Marine agar) en séparant le milieu des bactéries par une feuille de cellophane. Les ECP sont ensuite récupérés par centrifugation après 48 H d'incubation. Les produits extracellulaires (ou ECP) de *V. aestuarianus* 01/32 présentent un fort effet létal pour l'huître, et leur D.L.₅₀ a été établie à 3,3 µg protéines/g chair humide. Les produits extracellulaires semblent donc jouer un rôle majeur dans le mécanisme d'infection mis en œuvre par cette souche.

Des tests ont été réalisés *in vitro*, selon la technique de cytométrie de flux, afin de mesurer l'influence des ECP de *V. aestuarianus* 01/32 sur les paramètres hémocytaires de l'huître. Les hémocytes sont des cellules circulantes, impliquées dans de nombreux processus vitaux chez l'huître, dont les réactions de défense. Il a été montré que les ECP induisent *in vitro* une réduction importante des capacités hémocytaires de l'animal (réduction de la phagocytose et des capacités d'adhésion des hémocytes) en pouvant faciliter ainsi la dissémination du pathogène dans l'hôte (Figures 26 et 27). Une augmentation de la production d'oxygène actif (respiratory burst) par les hémocytes a été observée également. Les radicaux libres qu'ils produisent peuvent être toxiques pour l'animal (Curtin et al, 2002) au moment de la maturation où s'observe une réduction de la catalase et de la superoxyde dismutase qui ont pour fonction de les neutraliser. A l'inverse, les cellules de *V. aestuarianus* à la concentration de 50 cellules bactériennes par hémocyte sont sans effet notable sur ceux-ci après un temps de contact équivalent à celui des ECP.

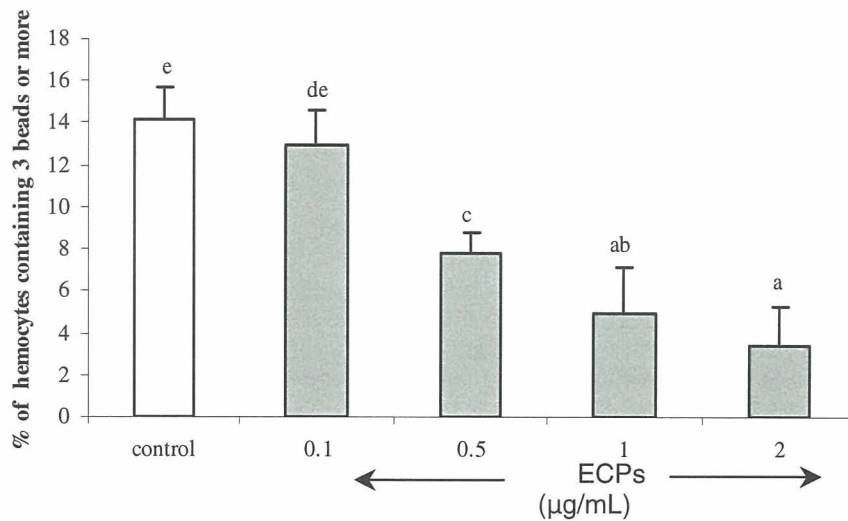


Figure 26 : Diminution de la phagocytose des hémocytes soumis à des concentrations faibles d'ECP après 1 heure d'incubation.

Une étude *in vivo* de l'action du vibron sur la réponse hémocytaire de *C. gigas* montre qu'il agit d'une manière identique aux ECP sur les hémocytes (Figure 27) avec apparition simultanée de la métallo-protéase dans l'hémolymphe. Par ailleurs l'expression de deux gènes, celui de l'inhibiteur de la métallo-protéase (TIMP) et celui de la Superoxyde Dismutase (SOD) ont été suivis au cours de l'expérience. Le TIMP n'est pas différenciellement exprimé au cours du temps et par rapport aux huîtres témoin injectées avec de l'eau de mer. Par contre, l'expression de la SOD décroît fortement après l'injection de *V. aestuarianus* d'un facteur 3,6 au jour 1 et 8,3 au jour 3 alors qu'elle reste stable chez les témoins.

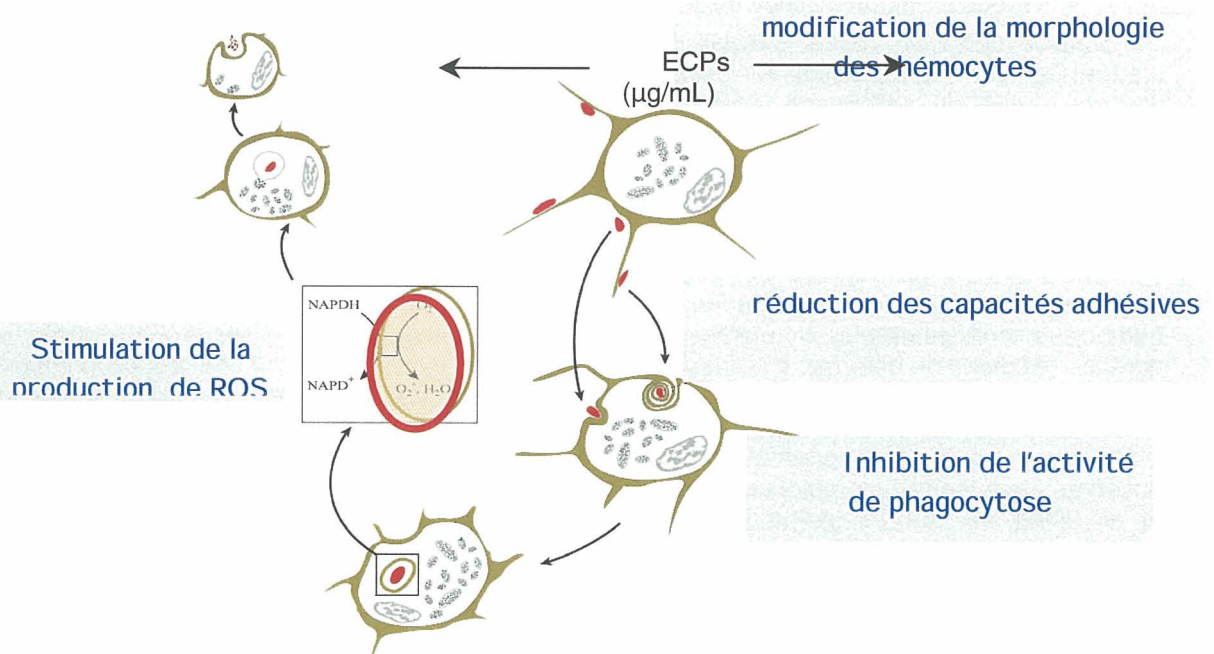


Figure 27 : Effets in vitro et in vivo des ECP sur les différentes fonctions des hémocytes conduisant à leur affaiblissement.



- Caractérisation des facteurs de virulence de *V. aestuarianus* 01/32

Des expériences d'inhibition de l'activité létale des ECP par de l'EDTA et par la phénanthroline qui réduisaient concomitamment l'activité protéasique ont orienté la recherche vers la purification d'une métallo-protéase.

Une purification de ces ECP a donc été entreprise selon des techniques de chromatographie par exclusion de taille en HPLC. Après analyse en spectrométrie de masse, une protéase a pu être identifiée : il s'agit d'une métallo-protéase zinc-dépendante. Elle est fortement létale par injection dans le muscle adducteur d'huîtres. La séquence complète du gène codant cette métalloprotéase a été obtenue par PCR à l'aide d'amorces dégénérées, puis clonée et séquencée. L'analyse de ce gène a révélé que la séquence en acides aminés déduite est très similaire à celles d'autres métalloprotéases produites par certains *Vibrio* pathogènes (84% d'identité avec la métalloprotéase EmpA de *V. anguillarum* (Norqvist et al 1990) . Le gène de cette toxine a pu être introduit dans un vibrio non pathogène *V. tasmaniensis* sans activité protéasique. Ses ECP ont montré alors une forte activité protéasique et un effet léthal sur les huîtres prouvant ainsi l'implication majeure de cette toxine dans le mécanisme d'infection.

Par une approche de banque soustractive (SSH) entre une souche pathogène (02/041) et une souche non pathogène (01/308), un certain nombre d'autres gènes codant pour des facteurs impliqués dans la virulence ont été identifiés : protéines d'exportation des molécules notamment.

- Modulation des facteurs de virulence

L'activité protéasique est modulable par des éléments nutritifs. Le mucus riche en polysaccharides et l'hémolymphe inhibent l'activité métallo-protéasique. Le glucose agit également dans ce sens ce qui laisse penser qu'en période d'épuisement des réserves en sucres la métallo-protéase pourrait être mieux exprimée. Cependant les taux de glucose dans l'hémolymphe semblent, quelle que soit la période de l'année, extrêmement bas. Cette inhibition peut être levée par ajout d'AMP cyclique. Il a été démontré chez certaines bactéries qu'en absence de glucose, le taux d'AMP cyclique intervient sur la transcription d'une série de gènes codant des enzymes intervenant dans la virulence bactérienne. Il semble qu'un tel système de régulation existe chez *V. aestuarianus* 01/32.

La baisse du taux de matière organique augmente la production d'activité protéasique, mais là aussi un écart existe entre les quantités de matière organique d'un milieu de culture et celles relevées en eau de mer.

L'injection de *V. aestuarianus* ne provoque la mort des huîtres qu'après un délai de 4-5 jours supérieur à celui des souches du groupe *V. splendidus*. Ceci semble dû au temps nécessaire à la production d'ECP (Extra-Cellular-products) par les cellules bactériennes. La mise en contact de celles-ci avec des hémocytes n'induit pas d'ailleurs de baisse des capacités hémocytaires contrairement à la plupart des vibrios. A l'inverse les ECP diminuent à des doses faibles les capacités de défense des hémocytes. Cette forte activité réside dans l'activité métallo-protéasique puisque son inhibition par la phénanthroline (par chélation du zinc) annule leur pouvoir pathogène. La purification de la métallo-protéase d'une part puis l'introduction de son gène dans une souche de *V. tasmaniensis* ont confirmé le rôle majeur joué par cette toxine dans la virulence de *V. aestuarianus*.

4.1.2 Chez les souches appartenant au groupe des *Vibrio splendidus*

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr Mazel (Institut Pasteur de Paris), le séquençage complet du génome de la souche LGP 32 a été réalisé. Ce travail correspond à l'étape ultime d'identification dans la mesure où dans ce cas l'ensemble du répertoire de gènes présent chez cette souche est désormais accessible et peut donc être comparé aux données existantes chez d'autres bactéries. Ce projet a nécessité la construction de deux banques : une banque d'ADN génomique de petits inserts (1-2 kpb) obtenus par nébulisation de l'ADN génomique, clonés dans le vecteur pCDNA1 ; une banque d'ADN génomique de grands inserts (50-100 kb) obtenus par digestion partielle par une enzyme de restriction (*HindIII*), clonés dans le vecteur pBeloBAC11. La phase de séquençage en shotgun est terminée et 50 000 séquences sont disponibles. Les contigs ont été assemblés et la phase de finition initiée en février 2004. Cette phase a consisté à résoudre toutes les zones de séquence de basse qualité ainsi qu'à déterminer les liens entre les contigs par comparaison aux génomes des *Vibrio* dont la séquence est disponible. L'annotation du génome a ensuite été conduite (Figure 28). D'une manière générale, les premières étapes d'annotation du génome ont permis d'ores et déjà de prédire environ 85% des gènes, permettant ainsi de se focaliser sur les

gènes de virulence possible et ouvrant la possibilité de débiter une analyse génomique utilisant la technologie des puces à ADN.

Les gènes de virulence qui ont été en particulier identifiés sont un *cps* operon pour la biogénèse de capsule, un *tad* operon codant pour l'adhésion/mobilité et des enzymes extracellulaires : 1 gène de la métalloprotease, 1 gène de la phospholipase 8 gènes pour des cytolysines homologues et 11 gènes de RTX homologues.

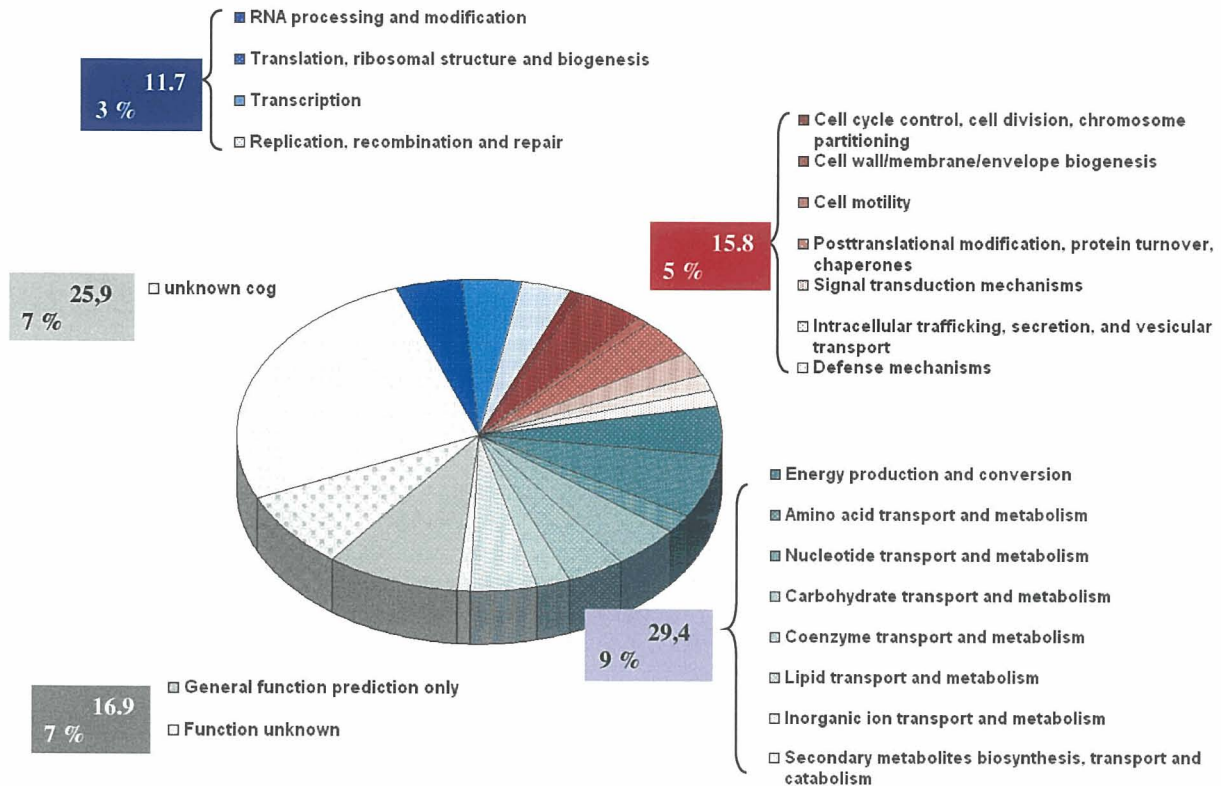


Figure 28. Annotation des 3954 gènes identifiés de *Vibrio splendidus* (2660 sur le chromosome 1 ; 1294 sur le chromosome 2)

En parallèle au séquençage complet du génome de LGP31, les bases moléculaires de la virulence de LGP32 et LGP31 sont abordées par une approche de génomique soustractive (banques SSH). Trois banques ont ainsi été construites à partir des souches LMG20012, LGP31 et LGP32. La souche type LMG20012, appartenant à l'espèce *V. tasmaniensis* et apparentée au groupe des *V. splendidus*, a été sélectionnée du fait d'une part que cette souche est avirulente en infection expérimentale pour l'huître creuse *C. gigas*, et de sa parenté génétique avec LGP 32 d'autre part. La banque génomique LGP32 soustraite des fragments de gènes communs avec la LMG20012 a permis, après séquençage et recherche d'homologies des séquences dans les bases de donnée, d'identifier des gènes candidats à la virulence. De même la banque génomique LGP32 soustraite des fragments de gènes communs avec la souche LGP31 et la banque inverse (LGP31 versus LGP32) ont permis d'identifier après séquençage et recherche d'homologie de séquences des gènes candidats à la virulence permettant d'expliquer l'agonisme entre ces deux souches (virulence accrue des souches LGP31 et LGP32 lorsqu'elles sont co-injectées chez l'animal). Plus de 700 séquences de fragments de gènes spécifiques de l'une des trois souches sont actuellement disponibles qui seront utilisées pour le développement prochain de techniques de typage génétique des souches environnementales par macroarray ou puces à ADN (Figure 29).

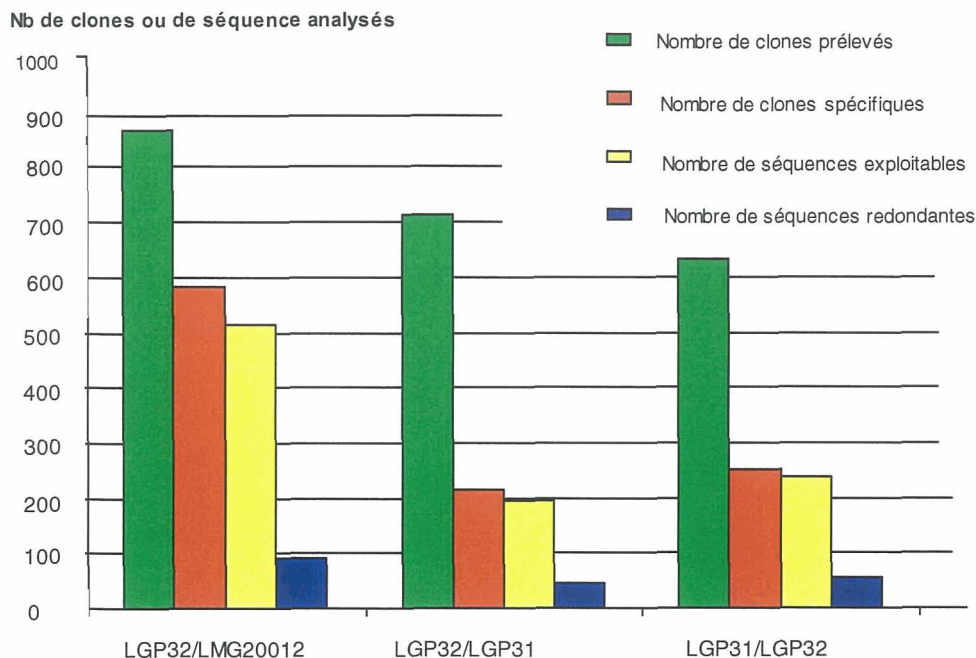
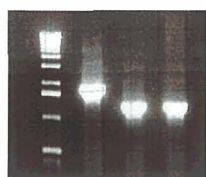
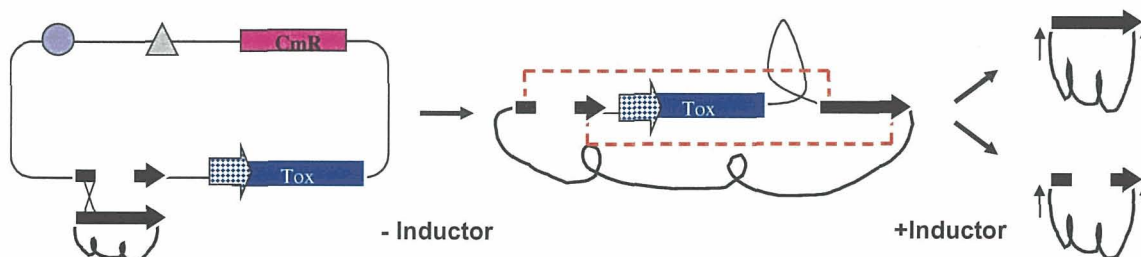


Figure 29 : Bilan du nombre de clones et séquences obtenus à chez les trois banques soustractives pour la recherche de gènes candidats à la virulence chez les souches apparentées au groupe *V. splendidus*

L'analyse des gènes candidats à la virulence identifiés par l'une ou l'autre des deux approches (séquençage complet du génome de LGP32 ou construction de banques soustractives) permet de mettre en évidence des gènes organisés en opéron potentiellement impliqués dans la biogénèse d'une capsule polysaccharidique, un gène de synthèse de lipopolysaccharide de la paroi bactérienne, des gènes potentiellement impliqués dans l'adhésion, des gènes impliqués dans les systèmes d'acquisition d'ion ferrique extracellulaire (sidérophore) ainsi que des protéases, hémolysines et autres toxines de type RTX. De façon intéressante, quelques un de ces gènes candidats à la virulence ont été identifiés au sein des deux banques soustractives construites : LGP32/LMG20012 et LGP32/LGP31.

La mise au point d'une stratégie de génétique inverse a par ailleurs permis de démontrer l'implication du gène codant la métalloprotéase de LGP32 dans la virulence. En effet, l'injection d'un surnageant de culture (ECP ou produits extracellulaires sécrétés par la bactérie) préparé à partir de cette bactérie mutée n'est pas létale pour l'huître alors que les ECP de la souche LGP32 le sont, à quantité de protéines injectées égales (Figure 30).



← 1833
← 1304

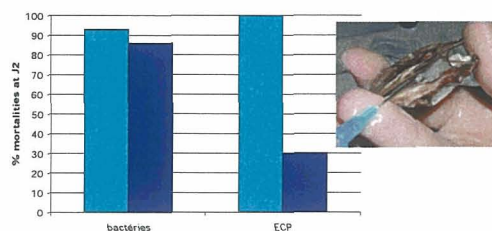


Figure 30 : Construction d'un mutant *V. splendidus* pour la métallo-protéase en utilisant la sélection positive d'un gène suicide. le gène de la métallo-protéase dont la partie centrale a été déléetée est intégré dans un vecteur plasmidique possédant un gène suicide, un gène de résistance au chloramphénicol et un gène inducteur. Les ECP de la bactérie mutée n'ont plus d'action létale sur les huîtres.



Actuellement 73 clones différentiels ont été analysés et 40% d'entre eux se sont révélés réellement spécifiques de 31. Ces clones présentent des homologies de séquences pour des gènes impliqués dans le transfert d'ADN exogène (transposon, intégroon, n=1), le métabolisme (n=7), la virulence (=6), ou codant pour des protéines membranaires (n=8).

Le criblage de la banque soustractive a été complété et certains gènes candidats chez LGP31 ont été analysés au niveau cadre de lecture complet, régulation et fonction. Parallèlement des tests de quantification de l'expression de ces gènes seront développés. Des biotests permettant la caractérisation de mécanisme de virulence des souches d'intérêt vont être mis au point. Ce sont :

- des tests d'adhérence, de mobilité et d'invasion
- la détection de protéases, phospholipases
- des profils LPS et protéines membranaires
- recherche d'exotoxine et d'endotoxines

5 Agents pathogènes et définition d'un risque

5.1 Variation temporelle de la flore *Vibrionaceae* dans le milieu marin et l'huître

Des suivis de la microflore ont été réalisés :

- en 2002 à Fort Espagnol (expérience Top-Flop) ;
- en 2003 à Marennes-Oléron (expérience DYNAMOR) ;
- en 2004 à Marennes-Oléron.

1. Pour l'expérience Top-Flop, des comptages sur Marine Agar (flore totale) ont été réalisés à intervalles réguliers de mai à septembre sur l'hémolymphe de cinq huîtres sensibles et cinq résistantes placées à 70 cm du sédiment complétés par quelques comptages de la flore bactérienne de la cavité palléale et de l'eau de mer. Les numérations ont été faites sur 5 huîtres par condition prise individuellement avec une incubation de cinq jours.

2. Un protocole identique à l'expérience précédente a été appliqué avec en plus des numérations systématiques des populations bactériennes de l'eau de la cavité paléale. Le dispositif expérimental était celui de l'expérimentation DYNAMOR. Le premier prélèvement d'huître a été traité à La Tremblade, les autres à Brest les huîtres maintenues au froid pendant le transport (24H).

3. L'objectif de l'étude réalisée en 2004 était d'étudier les variations spatio-temporelles de la flore *Vibrionaceae* par rapport à la flore totale, et la proportion des souches apparentées à *Vibrio splendidus* parmi cette flore cultivable.

5.1.1 Expérience Top-Flop

Les concentrations bactériennes augmentent régulièrement dans l'hémolymphe de début mai et jusqu'à fin juin correspondant à la période de maturation (Figure 31). Après la ponte qui a eu lieu début juillet, les niveaux de bactéries reviennent au seuil de la limite de détection ($<10^3$ ml⁻¹) indépendamment de la concentration bactérienne dans l'eau de mer. Peu de mortalité dans cette expérience a été enregistrée. Elle se manifeste juste après le pic bactérien. La microflore est restée diversifiée tout au long de l'expérience. Il y a une tendance mais non significative d'une plus forte charge bactérienne chez les sensibles « S » par rapport aux résistantes « R ».

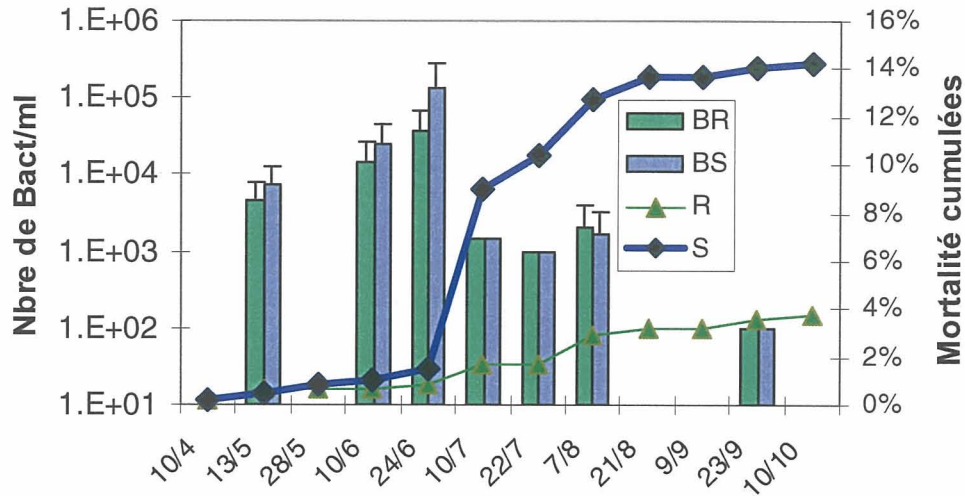


Figure 31 : Nombre de bactéries dans l'hémolymphe des huîtres R et S (BR et BS) en rapport avec les courbes de mortalités (Expérience Top-Flop à Fort espagnol en 2002)

5.1.2 Expérience DYNAMOR

En 2003, contrairement au suivi précédent, il n'y a pas eu de montée progressive des concentrations bactériennes. Elles sont importantes, entre 10^4 et 10^5 par ml, dès le mois de mai et se maintiennent à ce niveau jusqu'à mi septembre, sauf au moment de la ponte où elles atteignent des concentrations 10 fois supérieures (Figure 32).

Aucun pic bactérien ne précède ou accompagne les mortalités. Il y a une certaine relation entre la microflore de la cavité palléale qui est en général 10 fois plus élevée. Dans l'eau de mer, les fluctuations sont plus nettes, mais la méthode de prélèvement n'a pas été optimisée et suivant le point de prélèvement. La remise en suspension du sédiment les concentrations bactériennes peuvent être variables. Aucune différence significative n'apparaît entre les huîtres « R », « S » et les huîtres triploïdes qu'elles soient élevées à 15 ou à 70 cm.

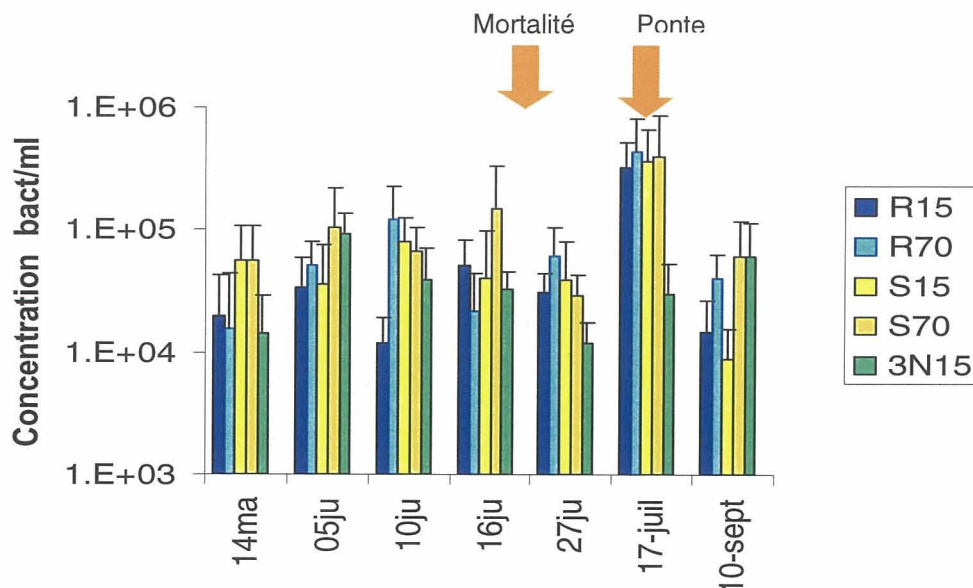


Figure 32 : Evolution de la microflore dans l'hémolymphe des huîtres de l'expérience DYNAMOR à Marenne-Oléron en 2003

5.1.3 Marennes Oléron 2004

L'objectif de l'étude réalisée en 2004 était d'étudier les variations spatio-temporelles de la flore Vibrionaceae par rapport à la flore totale, et de la part des *Vibrio splendidus* parmi ces Vibrionaceae.

Des huîtres de 18 mois, obtenues par captage naturel à Bonne Anse (17), ont été placées à 15 cm sur le site de Ronce les Bains en mars 2004. Un échantillon de 25 huîtres était prélevé une fois par mois d'avril à octobre 2004. En juin et juillet, en période de pré-ponte et de ponte, le pas d'échantillonnage a été augmenté et porté à une fois par semaine. Suivant la même fréquence et simultanément, un échantillon d'eau était récupéré dans des coupelles placées dans les poches ostréicoles.

Des analyses bactériologiques ont été réalisées dans l'eau de mer échantillonnée (trois réplicats) ainsi que dans l'eau intra-palléale et l'hémolymphe des huîtres (pool de cinq animaux, cinq réplicats). La population bactérienne cultivable a été quantifiée par numération sur marine Agar (incubation à 20°C pendant 48 h), ainsi que la fraction *Vibrio* cultivable après repiquage sur TCBS (incubation à 20°C pendant 24h). Par ailleurs, la fraction *Vibrio splendidus* related, a été évaluée par colony blotting. Le principe de cette technique repose sur l'hybridation de chaque colonie isolée avec 2 sondes marquées après extraction, dénaturation et fixation des ADN bactériens. L'une, la grande sous unité de l'ARNr, permet la détection des Vibrionacées, l'autre, un super integron de Mel 32, l'identification des *Vibrio splendidus*-related.

L'année 2004 a été caractérisée par une faible mortalité estivale des huîtres. Les résultats analytiques (Figure 33) ont mis en évidence des concentrations bactériennes (flore totale et flore Vibrionaceae) plus faibles qu'en 2004 dans tous les compartiments étudiés ($10^3 - 10^4$ /ml en 2004 versus $10^5 - 10^6$ /ml observés en 2003). Plusieurs hypothèses ont été évoquées : les températures ont été moins favorables en 2004 par rapport à celles observées l'année précédente ; par ailleurs, le protocole méthodologique était différent (temps de transport et durée d'incubation).

Une augmentation de la flore totale et de la flore *Vibrionaceae* a été observée dans le liquide intra palléal peu avant l'émission de gamètes. Des résultats expérimentaux obtenus lors de cohabitations ont montré que les gamètes pouvaient constituer un substrat favorable au développement des bactéries. Par contre, contrairement aux résultats présentés en 2003 nous n'avons pas observé d'augmentation de la flore bactérienne ou *Vibrionaceae* dans l'hémolymphe avant la ponte (Figure 29).

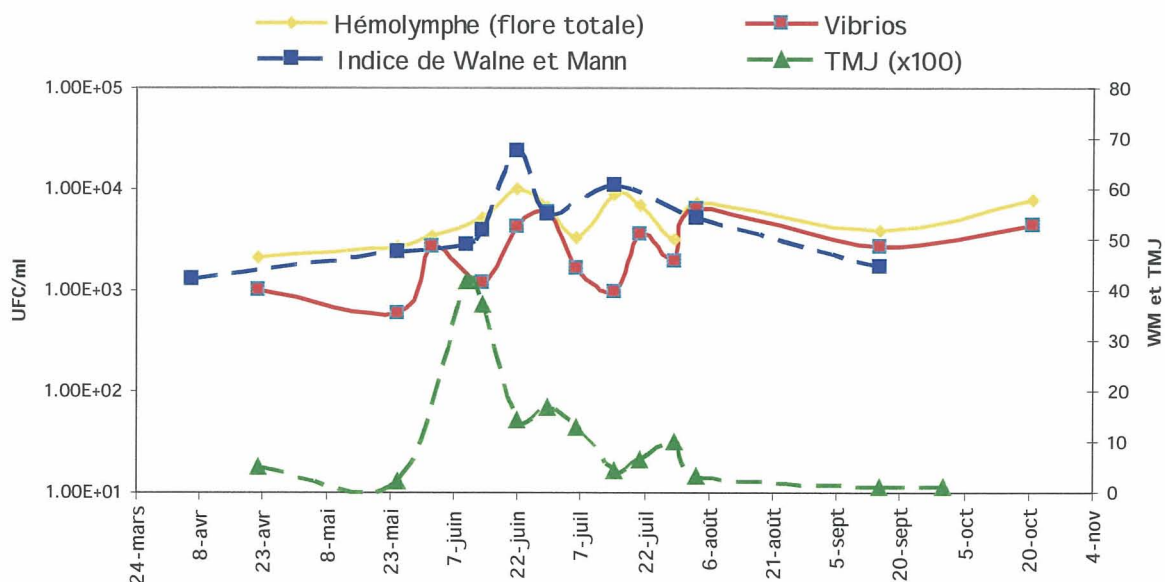


Figure 33. Le premier pic de *Vibrios* dans l'hémolymphe précède ou accompagne les mortalités alors que la flore totale reste stable. Le deuxième et troisième pics sont concomitants à des émissions de gamètes (indice de *Walne et Mann*) accompagné cette fois-ci de pics de la flore totale.

TMJ : Taux de mortalité journalière - WM : Indice de Walne et Mann

Les expériences d'hybridation sur colonies ont souligné que les vibrions apparentés à *V. splendidus* constituaient 70 à 100% de la flore *Vibrionaceae* cultivable. Cependant, ils doivent être considérés avec réserve, cette technique est encore au stade de développement méthodologique. Les



perspectives faisant suite à ce travail auront pour but de caractériser qualitativement les souches apparentées à *V. splendidus*, isolées de différents compartiments anatomiques d'huîtres élevées à 15 cm uniquement dans le cas où des mortalités sont observées sur le terrain.

Il existe une « microflore » dans l'hémolymphe des huîtres tout du moins à certaines périodes de l'année. A Auray (Fort espagnol) elle semble liée à l'état de maturation des huîtres qui, une fois la ponte passée, n'héberge quasiment plus de bactéries. A Marennes Oléron une flore relativement abondante est déjà présente au mois d'avril et se maintient sans relation apparente avec les changements environnementaux ou de l'hôte : température, matière organique, état physiologique de l'huître. Les seules fluctuations notables ont eu lieu juste après les pontes (fortement en 2003 et plus légèrement en 2004) et au moment de la mortalité en 2004. La flore *Vibrionaceae* est plus sensible à ces variations que la flore totale. Aucune différence significative n'apparaît entre l'intensité du portage des huîtres « S » et celui des huîtres « R ».

La porte d'entrée de ces bactéries reste inconnue. Les gonades peuvent être un premier organe de colonisation dès les premières pontes partielles. Pourtant ces bactéries sont présentes en dehors de la période de maturation et après la ponte. L'hypothèse d'un flux continu à partir de la cavité palléale ou extra-palléale est probable. Des expériences précédentes ont montré expérimentalement qu'une concentration importante de bactéries dans l'eau environnante entraînait leur apparition dans l'hémolymphe (Olafsen et al, 1993).

Les populations de *Vibrio* dans le milieu (eau et sédiment) sont vraisemblablement sous la dépendance des paramètres de l'environnement comme la température, le phytoplancton, la matière organique. Cependant, leur concentration dans les huîtres semblent relativement stables et n'augmentent qu'au moment de certains événements comme les pontes et la mortalité. Les pontes partielles pourraient représenter un facteur favorisant la multiplication des bactéries dans la cavité palléale (observation à Marennes Oléron) et pourraient stimuler l'expression des facteurs de virulence. Aucune information ne permet de penser que 19°C soit un seuil qui enclenche la prolifération des vibrios pathogènes ou augmente leur virulence. Des mortalités se sont produites en Baie des Veys à 13°C avec une forte présence de *V. aestuarianus*. Cette même bactérie a infecté des huîtres (tétraploïdes) à 9°C. L'optimum de croissance se situe au-dessus de celle-ci (23 et 28°C pour *V. aestuarianus* selon les souches). Le sédiment : il est le lieu de prédilection de *Vibrio aestuarianus* puisqu'il a été détecté dans tous ceux analysés à des concentrations relativement importantes. Il peut infecter les huîtres sans multiplication préalable dans l'eau ou dans les huîtres saines. Etudier les fluctuations des vibrios dans les sédiments en fonction du temps pourrait nous renseigner sur les périodes à risque.

5.2 Ecologie de *Vibrio aestuarianus*

L'objectif de cette étude est de suivre précisément une bactérie ciblée, *Vibrio aestuarianus* dans l'environnement et dans les huîtres pour connaître son occurrence et son comportement. Des sondes nucléiques ont été définies afin de détecter ou de quantifier spécifiquement *V. aestuarianus*. Un couple d'amorces spécifiques du 16S de *V. aestuarianus* (Vaest 64-99dir - Vaest 664-683rev) permet de détecter *V. aestuarianus* dans les sédiments après extraction d'ADN ou de vérifier que les colonies sur milieu gélosé sont bien des *V. aestuarianus*. Une sonde de 176pb qui s'hybride sur le gène *gyrB* (*gyr307-330dir* et Vaest *gyrrev3*) a été utilisée en colony blotting pour quantifier les colonies de *V. aestuarianus* sur milieu gélosé. Par ailleurs, il a été introduit le gène de la GFP (Green Fluorescent Protein) dans la souche (02/041) permettant de la quantifier directement sur Marine Agar lors d'expérimentation en microcosme.

In situ, des quantifications de flore bactérienne totale, des *Vibrionaceae* et de *V. aestuarianus* par colony blotting ont été réalisées dans le sédiment de différents sites (Arcachon, Marennes-Oléron, Golfe du Morbihan, Aber Wrac'h et Baie des Veys). Des infections expérimentales ont été également réalisées en microcosme. Dans les sédiments des sites choisis, la microflore totale peut être variable dans le temps (à Auray multiplication par 50 entre le 7 et le 21 juillet) ou bien stable (les autres sites) (Figure 30). Les vibrios peuvent représenter une fraction importante de la flore totale, mais fluctuent en fonction des sites et de la période (de moins de 1% à plus de 36%) (Figure 33). *V. aestuarianus* est présent dans tous ces lieux à des proportions élevées par rapport à l'ensemble des vibrios (jusqu'à 27% à Auray) (Figure 34).

Les essais en microscome ont permis d'avoir une première approche sur son comportement. *V. aestuarianus* tend à disparaître de l'eau sauf si des huîtres infectées en relarguent. Les huîtres saines, proches d'huîtres malades, ne deviennent pas porteuses pour autant. Aucun des tissus n'était contaminé, excepté la glande digestive de l'une des huîtres analysées. Un comportement de bactérie commensale n'est donc pas observé. Enfin il se maintient dans les sédiments à des niveaux relativement bas de l'ordre de 10^4 - 10^3 dans ces conditions expérimentales. Cependant, son « infectiosité » reste élevée puisqu'il peut infecter une huître à partir de ces faibles densités. Des mortalités se sont produites régulièrement pendant les 15 jours de l'expérience. Comme les tissus excepté la glande digestive dans un cas, ne sont pas porteurs apparents de ce vibrio. Les voies de pénétration dans l'huître restent hypothétiques.

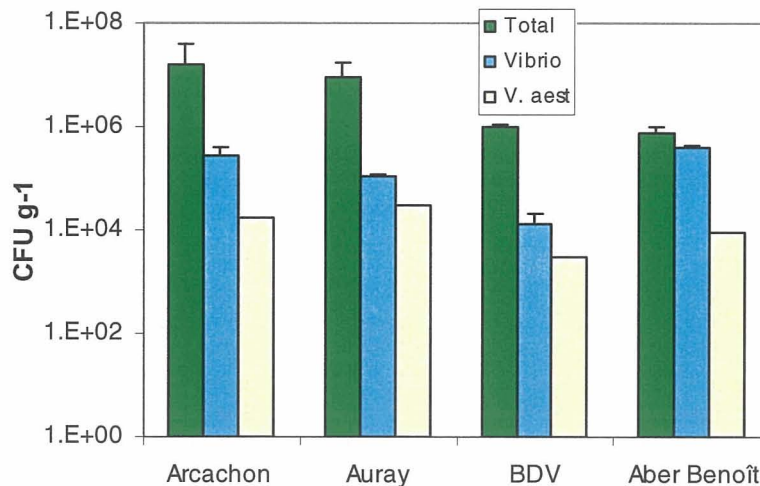
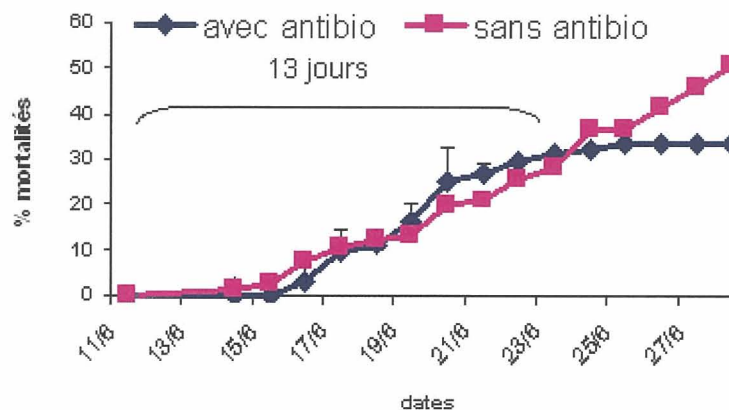


Figure 34 : Concentrations bactériennes sur Marine Agar (flore totale, Vibrionaceae, *Vibrio aestuarianus*) dans les sédiments le 21/07/05.

5.3 Suivi en milieu confiné des mortalités d'animaux élevés sur estran

Le but des expérimentations réalisées était de reproduire les mortalités observées sur l'estran en système confiné afin de suivre quotidiennement les animaux et tester l'hypothèse de l'implication de bactérie. Deux expériences dénommées Vali (Valeurs limites : placer les huîtres en situation de stress) ont été réalisées avec des huîtres sensibles (S) et résistantes (R) placées dans un site sujet aux mortalités (Fort espagnol, golfe du Morbihan), puis transférées dans des bacs à l'écloserie d'Argenton traités ou non avec des antibiotiques. La température a été montée progressivement à 19°C avant le début de l'expérience. Les mortalités journalières ont été suivies. Des analyses bactériologiques ont été effectuées régulièrement et des paramètres immunologiques ont été mesurés.



Dans l'expérience Vali 11 les courbes de mortalité des huîtres âgées de 18 mois se séparent entre les lots traités et les témoins seulement après 13 jours. L'effet retard de l'antibiotique (érythromycine) ne peut s'expliquer par une efficacité insuffisante de celui-ci puisque le pathogène identifié (*V.*

aestuarianus) chez les moribondes non traitées n'était plus présent chez les traitées. Deux hypothèses peuvent être émises :

- soit les huîtres infectées avant le traitement par des bactéries meurent très progressivement bien que le pathogène ait été éliminé
- , soit les huîtres sont mortes d'une cause physiologique ou virale.

Il est à noter que la dynamique de mortalité n'est pas accentuée par la présence de *Vibrio aestuarianus* dans le lot non traité et il faut attendre plus de 13 jours pour qu'on puisse lui attribuer une mortalité. (Figure 35)

Dans l'expérience Vali 2, les huîtres âgées de neuf mois ont été transférées dans les bacs expérimentaux alors que la mortalité avait démarré sur le terrain (19 juin) et avait déjà, décimé une partie importante (~ 50%) des huîtres S et commencé à atteindre les R. Elle s'est estompée assez rapidement chez ces dernières traitées (chloramphénicol). Toutefois, elle n'a pas été complètement jugulée et un bruit de fond de mortalité journalière persiste tout au long de l'expérience (Figure 36a). Des injections de filtrats 0.2 μ m d'huîtres moribondes « S » à des huîtres saines de deux ans ont permis d'induire des mortalités (origine virale ?) alors que les mêmes broyats filtrés d'huîtres R moribondes n'avaient pas d'effet (Figure 36b).

Par ailleurs la très forte mortalité enregistrée chez les sensibles peut être attribuée au virus OsHV-1 (présence de cet agent dans des lots mourants de professionnels à proximité). Les mortalités résiduelles chez les huîtres « R » traitées ne semblent s'expliquer qu'en reprenant les hypothèses évoquées pour l'expérience Vali1. Néanmoins l'hypothèse virale semble la moins probable puisqu'il n'y a pas eu de transmission par filtration à 0,2 μ m (Figure 36b) d'agent pathogène.

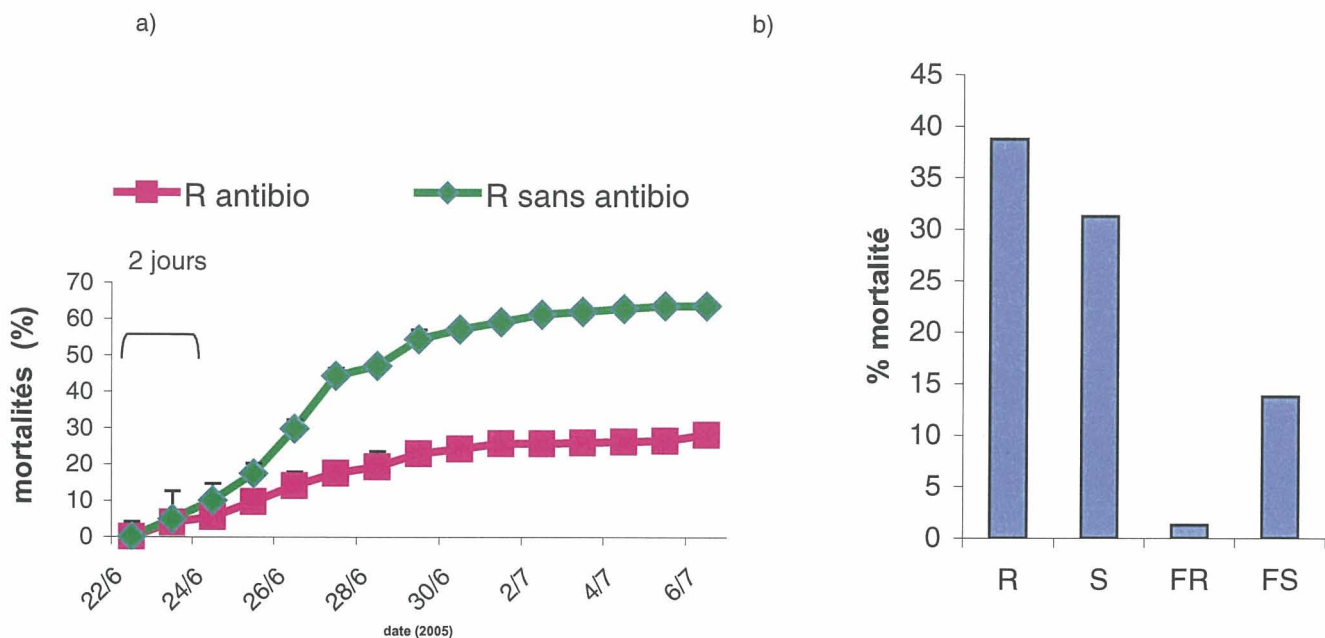


Figure 36 : (a) Mortalités cumulées de l'expérience Vali 2
(b) Injection de broyats d'huîtres malades R ou S) filtrés (F) ou non à des huîtres saines de 2 ans

Ces deux expériences menées avec des huîtres d'âges différents et traitées avec des antibiotiques donnent des informations sur les dynamiques et les causes de mortalités dans le milieu naturel. Dans les deux expériences, l'antibiotique utilisé ne permet pas de juguler complètement les mortalités laissant ouvertes les questions d'un autre agent pathogène (bactérie résistante au traitement antibiotique, virus, ...) ou d'un état physiologique très dégradé induit lui-même par une infection préalable ou par un stress. Enfin, le fait que *Vibrio aestuarianus* n'accroît pas les mortalités dans le lot non traité laisse suspecter que la souche présente n'avait pas de véritable pouvoir pathogène, mais seulement des facteurs de colonisation (invasive factors) lui permettant d'envahir des huîtres déjà très affaiblies.



6 Conclusion

L'examen des huîtres en cours de mortalités en période estivale par différentes techniques (histologie, bactériologie, virologie moléculaire) indique la présence d'agents pathogènes. Ainsi, l'herpèsvirus OsHV-1 est fréquemment détecté chez des huîtres de moins d'un an spécialement en période estivale, lors de montée de température. Cette observation vient d'être faite également aux Etats-Unis (Friedman et al 2005). Des bactéries du genre *Vibrio* (*V. aestuarianus* et *V. splendidus*) pathogènes sont également isolées dans au moins 40% des cas et jusqu'à 80% en prenant en compte les analyses faites dans le cadre du REPAMO. D'après ces dernières ils sont fréquemment isolés en association avec le OsHV-1 en cas de mortalité de naissain. Cependant, un même et unique pathogène n'est pas systématiquement détecté lors de phénomènes de mortalités estivales. Les infections observées restent de plus limitées dans le temps et dans l'espace.

En éclosion, les pathologies bactériennes se manifestent sur plusieurs semaines sans qu'un stress majeur puisse être identifié. Le confinement accentue la contamination de proche en proche. A l'inverse les événements de mortalités sur le terrain sont en règle générale brefs et ne se prolongent pas au-delà de quelques jours sauf en Baie des Veys.

Par ailleurs, les agents pathogènes identifiés se développent sous l'influence de facteurs environnementaux qui leur sont favorables (matière organiques, température) et de la physiologie de l'animal (chez des huîtres affaiblies par la maturation et par des conditions stressantes). Enfin, des interactions entre les micro-organismes expliquent également la capacité de certains agents à induire une maladie. Ces interactions rendent cependant plus complexe la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement d'une infection.

Dans un certain nombre de cas, aucun pathogène n'a pu être mis en évidence. En considérant que cette absence de détection ne correspond pas à une limite technique, ceci laisse à penser que comme pour toutes les autres espèces animales, les huîtres ne meurent pas que de maladies infectieuses.

En conclusion, les points suivants sont à noter en terme de pathologie :

1. - Pas d'agents infectieux (détectés) systématiquement associés aux épisodes de mortalités estivales ;
2. - Cependant, identification de candidats d'intérêt : bactéries du genre *Vibrio* et herpèsvirus OsHV-1 : ces agents sont capables d'induire des mortalités (particulièrement en milieu « confiné ») ;
3. - Aucune différence significative n'apparaît dans la sensibilité des huîtres « S » et celle des huîtres « R » au virus OsHV-1 et aux bactéries *V. splendidus* et *V. aestuarianus* ;
4. - Nécessité de mieux connaître les relations entre environnement, animal et pathogènes : l'environnement marin fluctue sans cesse et les huîtres et leurs pathogènes subissent ces fluctuations (relations complexes).
- 5 - Les agents pathogènes sont un risque à intégrer pour les productions en éclosion et nurserie
 - La maîtrise et la fiabilisation des outils, des intrants et des animaux est une obligation vis à vis des risques liés aux pathogènes pour les productions en éclosion et nurserie.
 - Un effort important doit être fait dans la « sécurisation » de ces stades où les contrôles sont possibles.
 - Les outils pour rechercher des pathogènes ciblés sont un des moyens indispensables pour contrôler la qualité de ces stades de production. Nous devons apprécier l'impact des pathogènes sur ces stades



Bibliographie

- Beattie, JH, Chew, KK (1981) Some relationships between gametogenetic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in the Washington state. J Shellfish Res 1: 9-16
- Boettcher, KJ, Barber, BJ, Singer, JT (2000) Additional evidence that juvenile oyster disease is caused by a member of the *Roseobacter* group and colonization of nonaffected animals by *Stappia stellulata*-like strains. Appl Environ Microbiol 66:3924-3930
- Bramble, L. and Anderson, R.S. (1997) Modulation of *Crassostrea virginica* hemocyte reactive oxygen species production by *Listonella anguillarum*. Developmental & Comparative Immunology 21, 337-348. McCarter, LJ (1999) The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus*. Mol Microbiol Biotechnol 1:51-57
- Curtin, J.F., Donovan, M. and Cotter, T.G. (2002) Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. J. Immunol. Methods 265, 49-72.
- Dungan, CF, Elston, RA (1988) Histopathological and ultrastructural characteristics of bacterial destruction of hinge ligaments of cultured juvenile Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Aquaculture 72: 1-14
- Elston, R, Frelier, P, Cheney, D (1999). Extrapallial abscesses associated with chronic bacterial infections in the intensively cultured juvenile Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Dis Aquat Org 37: 115-120
- Elston, RA (1993) Infectious diseases of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Annu Rev Fish Dis 3: 259-276
- Faury, N, Saulnier, D, Thompson, FL, Gay, M, Swings, J, Le Roux, F (2004) *Vibrio crassostreae* sp. nov., isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*). Int Syst Evol Micobiol 54: 2137-2140
- Ford, SE, Borrero, FJ (2001) Epizootiology and Pathology of Juvenile Oyster Disease in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. J Invertebr Pathol 78: 141-154
- Ford SE, Haskin HH. (1987); Infection and mortality patterns in strains of oysters *Crassostrea virginica* selected for resistance to the parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX). J Parasitol. 73(2):368-76.
- Friedman, CS, Beattie JH, Elston, RA, Hedrick, RP (1991) Investigation of the relationship between the presence of a Gram-positive bacterial infection and summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Thunberg. Aquaculture. 94: 1-15
- Friedman, CS; Estes, RM; Stokes, NA; Burge, CA; Hargove, JS; Barber, BJ; Elston, RA; Burreson, EM; Reece, KS (2005). Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. Dis Aquat Org 63 (1): 33-41
- Galtier, N, Gouy, M, Gautier, C (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. Comput Appl Biosci 12: 543-548
- Garnier M, Labreuche Y, Garcia C, Robert M and Nicolas J-LEvidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Microbial Ecology (accepté)
- Gay, M, Berthe, FC, Le Roux, F (2004) Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Dis Aquat Org 59:49-56
- Hine PM. (1996) Southern hemisphere mollusc diseases and an overview of associated risk assessment problems. Rev Sci Tech. ;15(2):563-77. Review.
- Lacoste, A, Jalabert, F, Malham, S, Cueff, A, Gilbert, F, Cordevant, C, Lange, M, Poulet, SA (2001) A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). Dis Aquat Org 46: 139-145



Le Roux, F, Goubet, A, Thompson, FL., Faury, N, Gay, M, Swings, J. & Saulnier, D. (2005) *Vibrio gigantis* sp. nov., isolated from haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*). Int J Syst Evol Microbiol 55, 2251-2255.

Le Roux, F, Gay, M, Lambert, C, Nicolas JL, Gouy, M, Berthe, FCJ (2004) Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus* related strains based on *gyrB* gene sequences. Dis Aquat Org 58: 143-150

Le Roux, F, Gay, M, Lambert, C, Waechter, M., Poubalanne, S, Chollet, B, Nicolas, JL, Berthe, FCJ (2002) Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. Aquat Living Resour 15: 251-258

Lipart, C, Renault, T (2002) Herpes-like virus detection in infected *Crassostrea gigas* spat using DIG-labelled probes. J Virol Methods 101:1-10

Lipp, PR, Brown, B, Liston, J, Chew, K (1976). Recent findings on the summer diseases of Pacific oysters. Proc Nat Shellfish Assoc 65: 9-10

Norqvist A, Norrman B, Wolf-Watz H.(1990) Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Infect Immun. 58(11):3731-6.

Olafsen, JA, Mikkelsen, HV, Giaever, HM, Hansen, GH (1993) Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperatures. Appl Environ Microbiol 59:1848-1854

Oliver LM, Fisher WS, Ford SE, Calvo LM, Burreson EM, Sutton EB, Gandy J. (1998). Perkinsus marinus tissue distribution and seasonal variation in oysters *Crassostrea virginica* from Florida, Virginia and New York. Dis Aquat Organ 34(1):51-61.

Paillard, C., Le Roux, F. and Borrego, J.J. (2004) Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies : Trends and evolution. Aquatic Living Resources 17, 477-498.

Renault, T, Lipart, C, Arzul, G (2001) A herpes-like virus infecting *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* larvae in France. J Fish Dis 24: 369-376

Renault, T, Le Deuff, RM, Cochennec, N, Chollet, B, Maffart, P (1995) Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: A comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. Vet Res 26 : 539-543

Sneath, PHA, Sokal, RR (1973) Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification, Freeman WH, San Francisco, pp 1288-1308

Thompson FL, Gevers D, Thompson CC, Dawyndt P, Naser S, Hoste B, Munn CB, Swings J (2005). Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. Appl Environ Microbiol. 71(9):5107-15.

Waechter, M, Le Roux, F, Nicolas, JL, Marissal, E, Berthe, F (2002) Characterisation of *Crassostrea gigas* spat pathogenic bacteria. C R Biologies 325:231-238

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

*Impression : Service IDM/RIC
IFREMER – Centre de Brest
BP 70 – 29280 Plouzané
Tél. : 02 98 22 43 53*