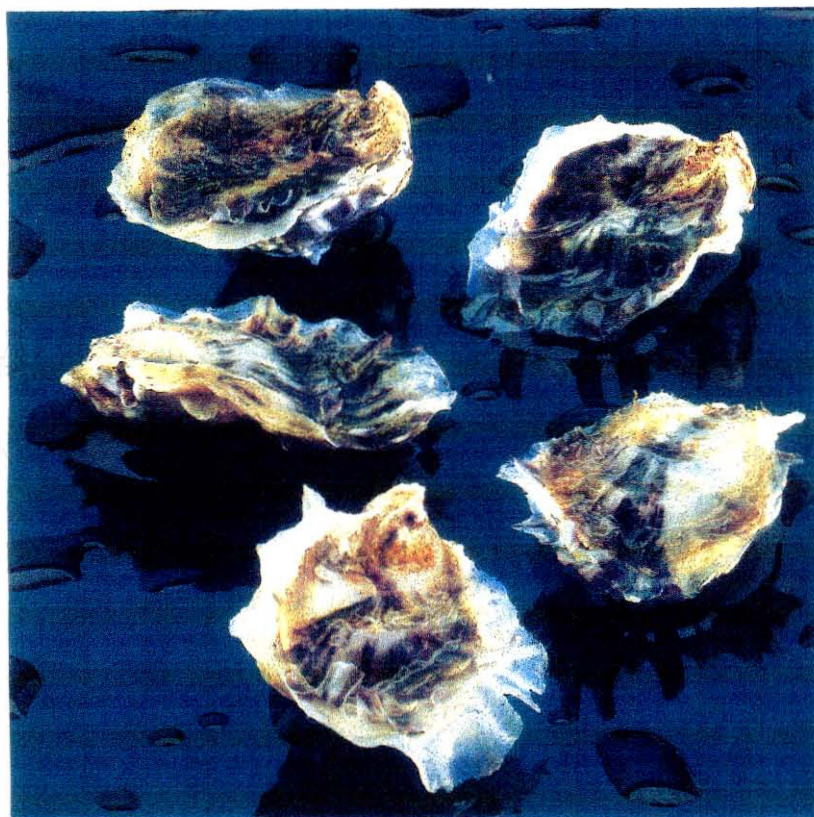


Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes
Formation en Aquaculture, Pathologie Aquacole et Environnement

Rapport de stage (mars-septembre 1996)

Magali Waechter

**Recherche de bactéries pathogènes du genre *Vibrio*
sur larves et naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas*,
au sein d'une éclosérie-nurserie de l'île de Ré.**



Grainocean
14 cours Déchezeaux
17410 St-Martin-de-Ré

en collaboration avec

le Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie
B. P. 133 - 17390 La Tremblade

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Hervé Le Bris pour ces bons conseils et pour sa volonté de faire toujours au mieux pour ses élèves. En espérant que d'autres passionnés d'aquaculture apprécient autant que nous cette formation.

Je veux remercier Eric Marissal pour son soutien dans mes travaux, pour la confiance qu'il m'a portée et pour le plaisir que j'ai eu à travailler pour son entreprise.

Je remercie Franck Berthe et Philippe Hoffner pour leurs conseils éclairés, leur implication dans mes travaux et pour leur agréable compagnie.

Je remercie Marie, Patricia et Maamar que j'ai eu le plaisir de revoir au cours de ce stage. En souvenir des bons moments passés ensemble pendant cette formation.

Je remercie aussi Totophe, David, Franck, Christophe, Sophie, Pascal, Pierre, Katia, Rébénice, Cécile, Nathalie... et que vivent les chercheurs fous!!

Je remercie enfin Tristan Renault, Rose-Marie Le Deuff, Bruno Challet, et toute l'équipe du GAP que j'ai eu plaisir à côtoyer tous les jours.

PLAN

INTRODUCTION	p 5
I) PRESENTATION ET SITUATION DE LA RECHERCHE	p 6
<u>I.1) Intérêt d'une recherche en bactériologie</u>	p 6
<u>I.2) Symptomatologie</u>	p 6
I.1.1) sur les larves	p 6
I.1.2) sur le naissain	p 6
<u>I.3) Présentation de l'entreprise Grainocean et choix des types d'approches</u>	p 8
I.3.1) Le suivi d'élevage	p 8
I.3.2) Les prélèvements ponctuels	p 10
I.3.3) L'induction expérimentale de mortalité	p 10
<u>I.4) les stratégies choisies pour la recherche en bactériologie</u>	p 10
I.4.1) Schéma de la stratégie utilisée en induction de la mortalité	p 10
I.4.2) Schéma de la stratégie utilisée en suivi d'élevage	p 11

**II) RECHERCHE D'AGENTS PATHOGENES INFECTIEUX EN RELATION
AVEC LES EPISODES DE MORTALITE** p 12

II.1) Le suivi d'élevage et les prélèvements ponctuels p 12

II.2.1) Matériel et méthode p 12

** Les prélèvements sur le terrain* p 12

- Le suivi d'élevage p 12
- Les prélèvements ponctuels p 12

** L'isolement des souches bactériennes* p 12

- Le traitement des prélèvements p 12
- L'étalement p 13
- La morphologie des colonies et le comptage p 13

** La conservation de souches* p 13

** L'identification des souches* p 13

- Coloration de Gram p 14
- Mobilité p 14
- Coloration de flagelles p 14
- Métabolisme respiratoire p 15
- Galerie API 10 E p 16

◇ Action sur les glucides p 16

◇ Production d'enzymes p 17

** L'exploitation des données* p 17

- Nomenclature des souches testées p 17
- Logiciel de classification des souches (CLASH) p 18
- Logiciel d'identification, Bactus p 18

II.1.2) Résultats p 19

** L'identification des souches* p.19

** La taxonomie numérique* p 19

II.2) <u>L'induction de la mortalité</u>	p 21
II.2.1) Matériel et méthode	p 21
* <i>Les lots testés</i>	<i>p 21</i>
* <i>Les protocoles utilisés</i>	<i>p 24</i>
II.2.2) Résultats	p 24
* <i>La mortalité induite</i>	<i>p 24</i>
• Expérience sur le naissain n'ayant subi aucune mortalité	p 24
• Expérience sur le naissain survivant suite à un épisode de mortalité	p 24
* <i>L'identification des souches</i>	<i>p 25</i>
II.3) <u>L'étude bactériologique complémentaire pour la recherche de bactéries pathogènes du genre <i>Vibrio</i>.</u>	p 25
II.3.1) Choix des bactéries à tester	p 25
II.3.2) Étude de la pathogénicité des souches	p 26
* <i>Matériel et méthode</i>	<i>p 26</i>
* <i>Résultats</i>	<i>p 29</i>
II.3.3) Utilisation des composés carbonés comme source d'énergie	p 30
* <i>Matériel et méthode</i>	<i>p 30</i>
* <i>Résultats</i>	<i>p 31</i>

III) DISCUSSION	p 32
III.1) <u>Résultats de l'étude</u>	p 32
III.1.1) Commentaires	p 32
III.1.2) Implication de l'herpès virus et de bactéries dans les phénomènes de mortalité	p 33
III.1.3) Etude à compléter	p 34
III.2) <u>Difficultés liées à l'étude bactériologique en milieu marin</u>	p 34
III.2.1) Spécificité des souches marines	p 34
III.2.2) Variation de la morphologie des colonies au sein du genre <i>Vibrio</i>	p 35
III.3) <u>Difficultés rencontrées en pathologie expérimentale</u>	p 37
III.3.1) L'induction de la mortalité	p 37
III.3.2) L'étude de la pathogénicité des souches	p 37
III.3.3) Les problèmes posés par ces expérimentations sur les mollusques bivalves	p 38
CONCLUSION	p 39
BIBLIOGRAPHIE	
ANNEXES	

INTRODUCTION

La production d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, est la principale production française de coquillages et la plus importante source de revenu du département de la Charente-Maritime. Le naissain est principalement obtenu par captage naturel mais l'utilisation de naissain d'écloserie est en progression depuis quelques années.

De forts taux de mortalité estivale, pouvant atteindre 60 à 100% sont rapportées actuellement dans les éclosiers-nurseries, sur les larves et le naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Dans le milieu naturel, la mortalité apparaît aussi sur le naissain de captage naturel. Cette mortalité est difficile à évaluer car les informations à ce sujet sont souvent contradictoires. En ce qui concerne le naissain de captage naturel, la mortalité est de surcroît difficile à apprécier car leur qualité est très variable selon les années, en fonction des conditions climatiques.

Ce type de mortalité a été observée dès 1991 dans les éclosiers nurseries peut-être en raison de l'intensification de ces élevages qui fait apparaître les problèmes de manière plus évidente. L'huître plate, *Ostrea edulis* est, elle aussi, touchée par ce phénomène.

Des études ont été menées pour rechercher la cause de la mortalité estivale. Un agent pathogène de type herpès a été mis en évidence par observation en microscopie électronique à transmission (Nicolas *et al.*, 1992) en relation avec de la mortalité larvaire. Des mortalités associées à la détection d'un virus de type herpès ont également été rapportées sur naissain d'huître plate (Comps et Cochenec, 1992) et d'huître creuse (Renault *et al.*, 1994). La pathogénicité de ce virus de type herpès a été prouvée pour les stades larvaires (Le Deuff *et al.*, 1994) mais la reproduction expérimentale de la maladie sur le naissain, touché lui aussi par ces mortalités, fait encore l'objet d'étude.

La corrélation entre les très fortes mortalités subies en 1995 par l'écloserie-nurserie Grainocean (Ile de Ré) sur du naissain et la présence du virus n'apparaissait pas de manière évidente.

Au début de l'année 1996, l'entreprise Grainocean et le laboratoire GAP (IFREMER de Ronce les Bains) ont convenu d'un programme de recherche en bactériologie sur des échantillons de l'écloserie-nurserie.

La découverte de l'agent virale n'excluant pas la possibilité de l'intervention d'un agent pathogène bactérien, nous avons entrepris d'étudier la flore bactérienne en relation avec des épisodes de mortalité. En parallèle, un contrôle en PCR a été réalisé pour rechercher le virus de type herpès sur les lots utilisés dans cette étude.

Aucun prélèvement provenant du milieu naturel n'a été traité au cours de cette étude car les anomalies et la mortalité sont détectées plus tardivement qu'en écloserie-nurserie et les échantillons fournis ne permettent pas une analyse bactériologique du fait de leur état de dégradation. Nous avons donc effectué la recherche en bactériologie uniquement sur les prélèvements de l'écloserie-nurserie Grainocean sur un cheptel observé quotidiennement et avec un suivi des mortalités plus adapté à cette étude.

L'étude que nous allons vous présenter doit être considérée comme une première approche pour laquelle nous avons choisi d'étudier les souches du genre *Vibrio*, réputés pour leur pathogénicité en milieu marin.

I) PRESENTATION ET SITUATION DE LA RECHERCHE

Cette recherche a été rendue possible grâce à la collaboration de l'entreprise Grainocean et de la station de l'IFREMER de Ronce les Bains, qui ont fourni respectivement les échantillons et les installations de recherche.

I.1) Intérêt d'une recherche en bactériologie

L'entreprise Grainocean connaît depuis le printemps 1995 de fortes mortalités sur le naissain et ponctuellement sur les larves de quelques pontes, avec une évolution brutale de type toxique ou infectieuse. La première hypothèse explorée pendant l'année 95 fut l'infection par l'herpèsvirus. La corrélation entre les mortalités subies dans l'entreprise et la détection du virus n'était alors pas évidente.

De grandes similitudes existent avec des maladies bactériennes déjà connues. La maladie décrite sur les larves en phase de mortalité est assez semblable aux affections bactériennes en élevage larvaire déjà décrites chez *Crassostrea virginica* (Grinschkovsky, 1974; Elston and Leibovitz, 1980). Quant à la maladie décrite sur le naissain à Grainocean, elle ressemble curieusement à la JOD (Juvenile Oyster Disease; Elston, 1992, Bricelj *et al.*, 1992; Elston, 1992; Davis, 1994) de l'huître américaine *Crassostrea virginica* et à la maladie de l'Anneau Brun de la Palourde *Ruditapes philippinarum* (Paillard *et al.*, 1992).

Les bactéries du genre *Vibrio* étant souvent impliquées dans ces affections, nous avons été particulièrement attentifs quant à ce genre.

Des résultats intéressants ont été obtenus à l'entreprise Grainocean lors d'une expérience de diagnostic thérapeutique à base d'antibiotiques sur des larves en phase de mortalité. Après traitement d'un lot de larves à la gentamycine, la mortalité s'est arrêtée en quelques jours. Le lot témoin, non traité, a subi 100% de mortalité. Devant l'efficacité d'un antibactérien face à une pathologie de type infectieuse, l'hypothèse d'un agent pathogène bactérien semble intéressante à explorer.

I.2) Symptomatologie

I.2.1) Sur les larves

Les larves présentent une nage anormale, sédimentent et meurent en 24 à 48 heures en absence de traitement. On observe des fragments du vélum libres qui se déplacent dans l'eau d'élevage.

Ces symptômes sont communs à plusieurs maladies infectieuses en élevage larvaire, notamment à des bactérioses (Grinschkovsky, 1974; Elston and Leibovitz, 1980) et l'infection par l'herpèsvirus.

I.2.2) Sur le naissain

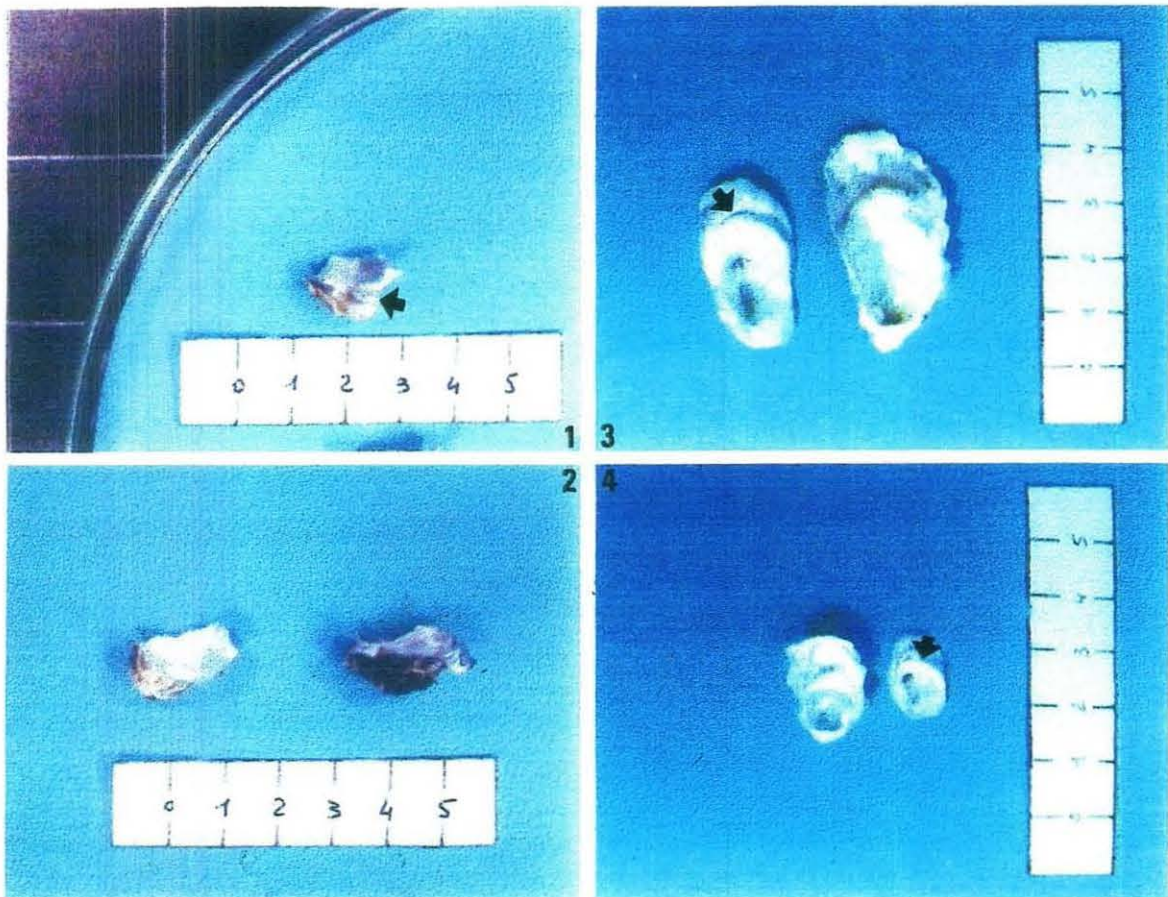
Le premier symptôme observé est une extraordinaire croissance du naissain qui double de volume en 3 jours.

Ensuite, les jeunes huîtres se mettent à "bailler": elles sont encore vivantes mais ne peuvent plus refermer leur valves. Le naissain meurt après chaque manipulation comme par exemple lors des calibrages. Beaucoup de jeunes huîtres présentent une forme particulière de la coquille dite "en sabot" (Cf photos 1 et 2). Cette anomalie de pousse des deux valves paraît

résulter d'une absence de migration du muscle adducteur au moment de la croissance. Ce phénomène empêcherait la pousse en longueur de la valve inférieure qui compenserait par une pousse en hauteur. Dans ce cas, le muscle adducteur qui constitue un lien très fort entre les valves entraîne une pousse moindre de la valve supérieure qui s'adapte à la forme creuse de la valve inférieure

De forts taux de mortalité (de 50 à 60%) apparaissent brutalement en 24 à 48 heures pour finir avec 100% de taux de mortalité cumulée en une semaine.

Les survivantes développent un dépôt anormal de conchyoline (Cf photos 3 et 4), avec une rétraction du manteau. On note aussi très fréquemment une modification du rythme de la pousse de la coquille ce qui entraîne l'apparition d'une "strie" d'arrêt de croissance.



I.3) Présentation de l'entreprise Grainocean et choix des types d'approches

Le choix des prélèvements est particulièrement important en bactériologie. Il est judicieux de restreindre le nombre de prélèvements pour éviter de disperser les recherches, une étude bactériologique, quand l'agent pathogène recherché n'est pas connu, étant un travail fastidieux.

Une étude bactériologique s'effectue sur un prélèvement récent afin d'éviter qu'une flore non spécifique ne se développe. Les prélèvements sont acheminés vivants, rapidement, légèrement réfrigérés et sont traités dès la réception.

Nous avons fait le choix de différentes approches complémentaires.

I.3.1) Le suivi d'élevage

Cette approche nécessite une connaissance de l'entreprise et des différentes étapes de la production du naissain. Pour cela, il faut aller sur le terrain, à l'écloserie nurserie, afin de définir les différents compartiments épidémiologiques, c'est à dire les étapes ayant le même statut sanitaire et les moments où ce statut change. Les prélèvements sont effectués à chaque fois que le statut sanitaire est modifié.

Le suivi d'élevage peut permettre de définir la ou les étapes sensibles de l'élevage et de connaître le moment de la contamination par un agent pathogène.

Le choix des prélèvements en suivi d'élevage est justifié par l'éclatement géographique de l'entreprise Grainocean en différents endroits de l'île de Ré.

Les techniques d'élevage utilisées sont originales et conçus pour une production intensive.

- **L'élevage larvaire**

Les locaux d'élevage larvaire et la fixerie se situent dans un même bâtiment au lieu dit le Coin Sableux à Ars-en-Ré. La micronurserie se trouve près de ce bâtiment dans la claire attenante.



L'élevage larvaire s'effectue dans deux cuves parallélépipédiques en inox de 20 m³ chacune et utilisées alternativement, à chaque tamisage: toutes les 48 heures, les larves sont tamisées, rincées et remises en eau propre dans l'autre cuve. L'eau d'élevage larvaire est filtrée par une membrane plissée à 0,25 µm et passée aux U.V. avant de remplir les cuves (Lewis, 1982 et Elston, 1984). Les larves d'un élevage donné proviennent toutes d'une même ponte. La densité d'élevage est de 3 larves par ml

- La nurserie du Boutillon

La nurserie industrielle et le système de mise en lanterne du naissain se situe au Boutillon entre La Couarde et Ars-en Ré



La nurserie industrielle du Boutillon est construite pour fonctionner en circuit fermé, le renouvellement de l'eau se faisant par recirculation de l'eau de sortie de l'élevage après un long trajet dans les marais. Ce système permet à l'eau de se débarrasser de ses matières organiques et de s'enrichir en phytoplancton, celui-ci se développant naturellement dans le marais. L'eau est rechargée en oxygène par un système de turbine à l'entrée de l'élevage.

- Le prégrossissement en mer

Le naissain est placé en prégrossissement dans des lanternes ostréicoles Grainocean, les LOG, dans le Pertuis breton.

I.3.2) Les prélèvements ponctuels

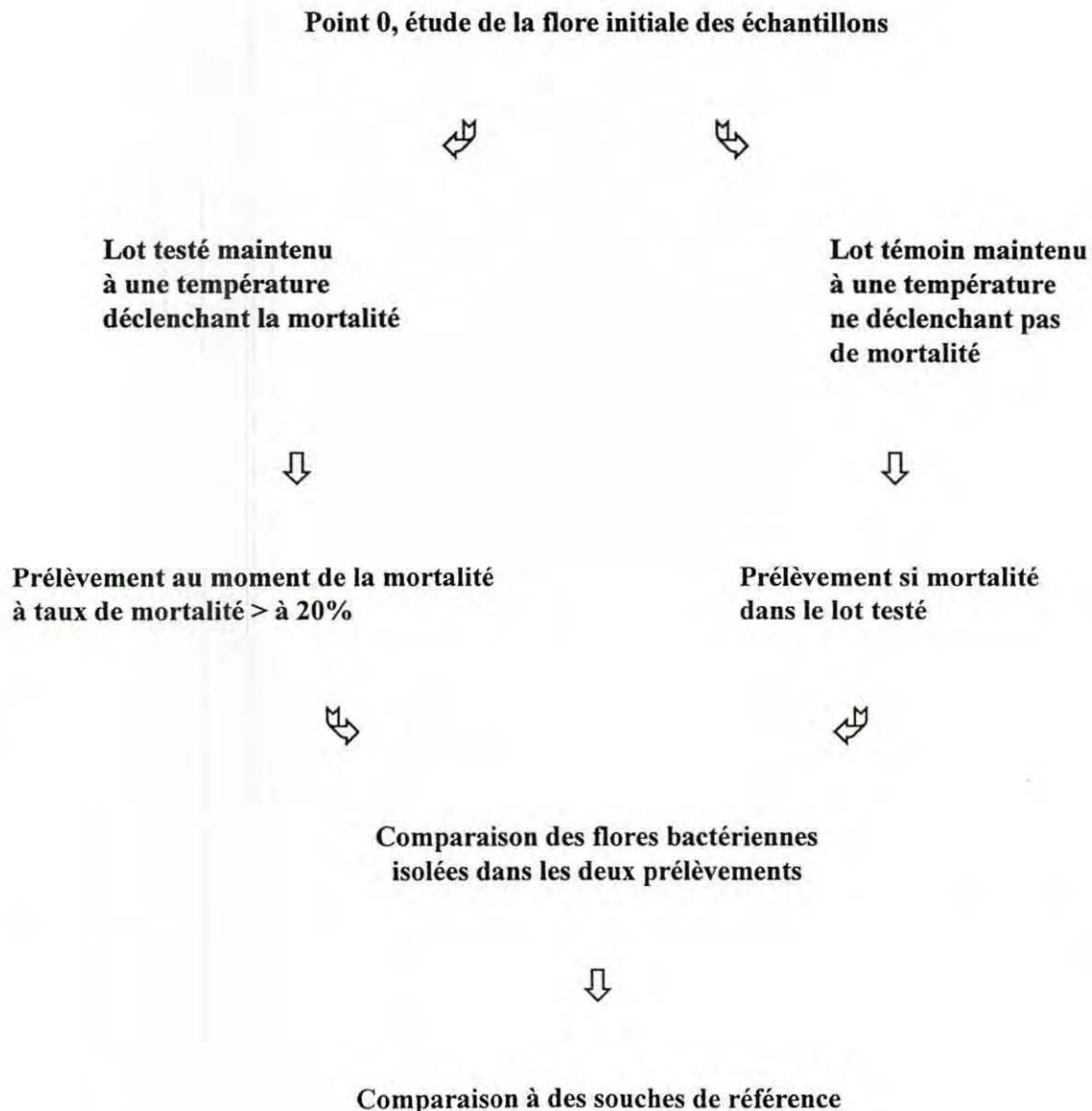
Ces prélèvements sont effectués dès la détection d'anomalies ou d'épisodes de mortalité.

I.3.3) L'induction expérimentale de mortalités

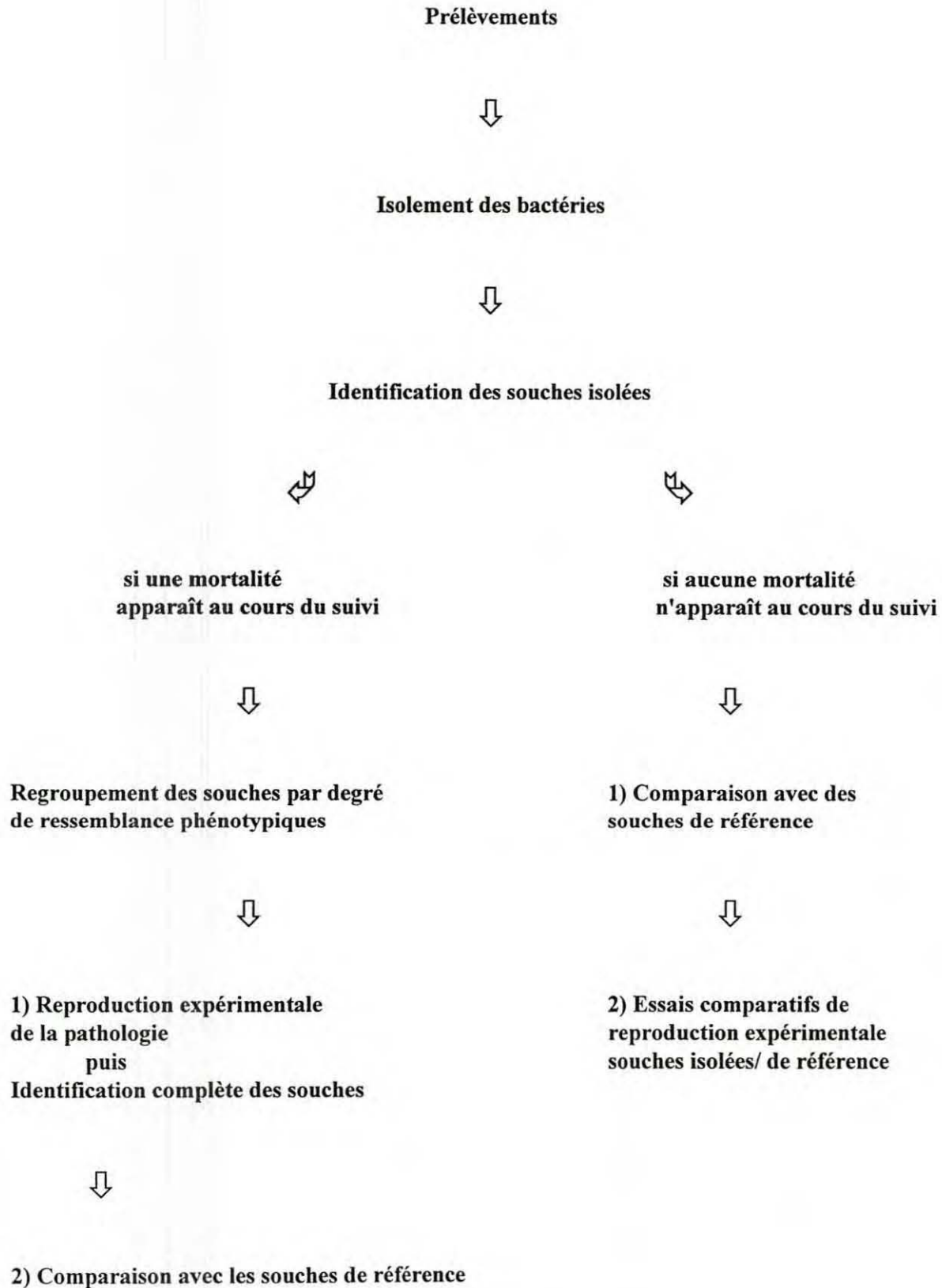
La mortalité est induite en bac dans la salle de pathologie du laboratoire GAP de l'IFREMER de Ronce-les-Bains par augmentation progressive de la température

I.4) les stratégies choisies pour la recherche en bactériologie

I.4.1) Schéma de la stratégie utilisée en induction de la mortalité



I.4.2) Schéma de la stratégie utilisée en suivi d'élevage



II) RECHERCHE D'AGENTS PATHOGENES INFECTIEUX EN RELATION AVEC LES EPISODES DE MORTALITE

II.1) Le suivi d'élevage et les prélèvements ponctuels

II.1.1) Matériel et méthode

**Les prélèvements sur le terrain*

- Le suivi d'élevage

Les échantillons ont tous été prélevés sur place, transportés dans une glacière fraîche (~ 15°C) en 1 heure jusqu'au laboratoire et traités immédiatement en bactériologie.

Les dates des prélèvements sont:

- le 10 04 96, à J20 sur les larves T 250 µm (**lot 1A**) et eau d'élevage (**lot 1B**),
- le 03 06 96, à T 5 mm, (**lot 3**) à la sortie du naissain en nurserie industrielle au Boutillon,

Remarque: Un troisième prélèvement était prévu après sortie du naissain en mer sur lanterne ostréicole Grainocean (LOG) mais une mortalité totale est intervenue sur ce naissain au niveau de la nurserie du Boutillon en juin 96, nécessitant alors un prélèvement ponctuel.

- Les prélèvements ponctuels

Le 10 06 96, prélèvement (**lot 4**) effectué à 60% de taux de mortalité au Boutillon sur le naissain du suivi d'élevage,

Le 21 08 96, prélèvement (**lot 6**) effectué à 50% de taux de mortalité 2 jours après la sortie en micronurserie d'un naissain issu d'une autre ponte.

** L'isolement des souches bactériennes*

- Les milieux utilisés

La gélose de ZoBell que nous avons appelé Marine Agar (MA) dans cette étude permet de faire pousser la majorité des souches présentes dans le milieu marin. Elle se compose de :

15 g d'agar, 4 g de peptone,
1 g d'extrait de levure
pour 1 l d'eau de mer artificielle à 2%,
le pH étant ajusté à 7,4 avant autoclavage.

La gélose TCBS (Thiosulfate, Citrate, Bile, Saccharose agar; Sanofi Diagnostics Pasteur; Réf : 64654) est un milieu sélectif pour les Vibrionacés.

- Le traitement des prélèvements

Le traitement appliqué dépend du prélèvement. L'eau d'élevage est uniquement diluée alors que le naissain doit au préalable être décoquillé et broyé dans un Potter. Les larves sont directement broyées.

Le broyat est effectué dans un volume de 50 ml d'eau de mer stérile (EMS) pour 14 g de chair.

Les dilutions utilisées sont différentes suivant le milieu gélosé où se fait l'étalement:

- sur Marine Agar (MA), les dilutions sont en général de 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} .
- sur TCBS, les dilutions sont moins importantes car le TCBS est un milieu sélectif pour les vibronacés. On utilise donc les dilutions suivantes: "pur", 10^{-1} , 10^{-2} .

- L'étalement

Un volume de 0,1 ml de chacune des dilutions est étalé sur un milieu gélosé préalablement coulé en boîte de Pétri. L'étalement est effectué grâce à une pipette Pasteur travaillée en forme de "râteau" qui sert à répartir le volume versé sur toute la surface de la gélose.

- La morphologie des colonies et le comptage

Après 24 heures d'incubation dans une étuve à 21°C (sauf dans le cas des prélèvements de larves et d'eau d'élevage larvaire dont l'incubation a été faite à 24° C en relation avec les températures rencontrées dans ces élevages), les géloses sont examinées. Les colonies bactériennes de morphologies différentes sont repérées selon leur taille, couleur, production d'un pigment qui colore la gélose, coloration jaune de la colonie et de la gélose sur TCBS (jaune si la bactérie utilise le saccharose), opacité/transparence, régularité des contours, profil convexe/plat, autre caractère particulier...

Les boîtes d'origine font l'objet d'un comptage par type de colonie afin d'avoir une idée du nombre de bactéries (UFC= unités formant colonie) présentes dans le prélèvement et de repérer les types prédominants.

Les différents types de colonies sont nommés et isolés sur MA. Ces boîtes sont ensuite placées à l'étuve pendant 24 heures.

* *La conservation de souches*

Les boîtes d'isolement des différentes colonies sont examinées après 24 heures d'incubation afin de vérifier si la culture est pure.

Deux types de conservation sont effectuées à partir des boîtes d'isolement : les conservations de longue et de courte durée.

Il est possible de conserver des souches pendant plusieurs mois à une température constante et modérée (~10°C) dans des tubes de conservation (Sanofi Diagnostic Pasteur, réf: 63683) par piqûre centrale d'une colonie.

Il est également intéressant de conserver les souches sous une forme plus pratique et facile à réutiliser. Dans ce cas, le milieu de conservation de choix est la gélose en pente (gélose MA en quantité suffisante dans un tube, stérilisé à l'autoclave et mis à refroidir avec une inclinaison permettant d'obtenir une pente et un culot). Une colonie du milieu d'isolement est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur, mise en suspension dans le liquide de condensation,

piquée dans le culot et étalée sur la pente. Ce type de conservation est renouvelé tous les mois environ.

** L'identification des souches*

Les différents tests de l'identification des souches nécessitent pour la plupart une culture de 24 heures sur gélose nutritive.

Les 17 tests utilisés sont reportés sur une fiche d'identification propre à chaque souche (Cf annexe 1).

- Coloration de Gram

Cette coloration est réalisée selon le protocole de l'Institut Pasteur (Kit Gram, Sanofi Diagnostics Pasteur; réf. 55281). Les lames sont observées au microscope optique (x 1000, immersion).

La coloration de Gram permet de différencier deux grands groupes de bactéries: les Gram + et les Gram - .

Elle est aussi très intéressante pour observer la morphologie des bactéries (bacille ou coque).

- Mobilité

La recherche de la mobilité se fait sur le culot de condensation de la gélose en pente, les bactéries s'y développent très bien et sont très actives. Une goutte de cette suspension est montée entre lame et lamelle et observée au microscope optique (x1000, immersion).

- Coloration des flagelles

Cette coloration, beaucoup plus simple d'utilisation que la coloration à l'argent, permet d'observer le type de locomotion employée par les bactéries. Son utilisation demande une certaine habitude tant au point de vue de la réalisation que pour la lecture.

◇ Composition

Solution A : à rajouter à froid dans l'ordre indiqué

Phénol (pour analyse, Carlo Erba).....	5 g
Alcool absolu.....	5 ml
Violet cristallisé (Merck).....	3 g
Eau distillée.....	100 ml
Tannin purifié (Sigma).....	20 g

Solution B : Solution saturée à 50°C

Aluminium potassium sulfate dodécahydrate (pour analyses, Labosi).....	50 g
Eau distillée.....	100 ml

Mélanger à volume égal les solutions A et B à 60-70°C.

Laisser reposer 24 heures

Conserver à l'abri de la lumière à température ambiante

◇ Réalisation des lames

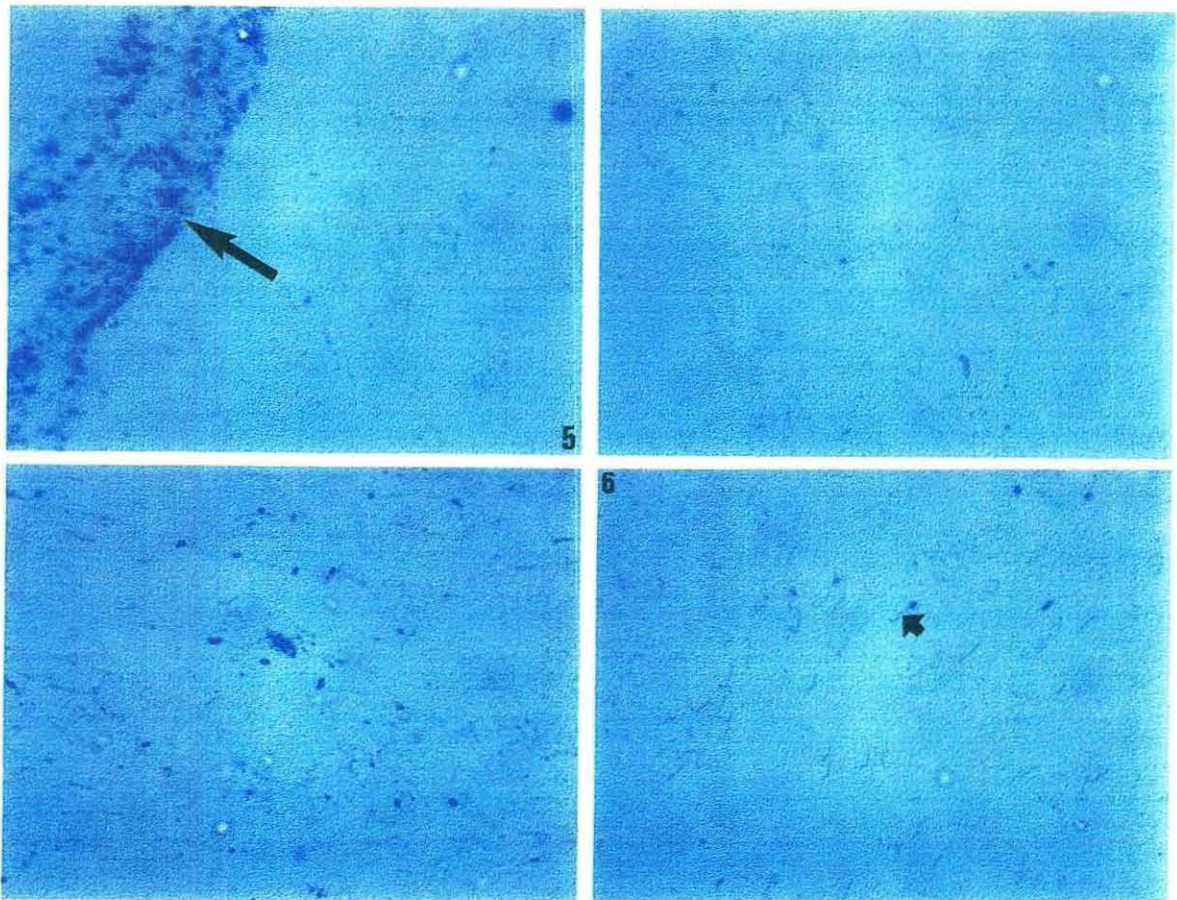
Déposer une goutte du culot liquide d'un tube en pente sur une lame, recouvrir avec une lamelle et déposer immédiatement une goutte de la coloration qui diffuse par capillarité entre lame et lamelle dans la partie encore sèche.

◇ Lecture

La lame est observée à l'immersion (x1000)

La profondeur de champ est réglée de manière à observer la phase supérieure (les bactéries se trouvant contre la lamelle). La partie la plus riche en flagelle est la limite de diffusion des bactéries dans le colorant (Cf photo 5).

La coloration demande une habitude de pratique mais quand elle est maîtrisée, elle est intéressante (Cf photo 6).



- Métabolisme respiratoire

✧ Oxydase

La recherche de l'oxydase se fait à partir de disques imprégnés d'oxalate de diméthyl-paraphénylène-diamine (Sanofi Diagnostics Pasteur, réf. 53831). La réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration violette après dépôt d'une parcelle de culture prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur.

✧ Voie d'attaque des glucides

L'étude de la voie d'attaque du glucose est réalisée sur milieu MEVAG (Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides). Deux tubes additionnés de glucose stérile (solution filtrée à 0,22µm) sont nécessaires pour chaque souche: un tube en aérobie qui vire du rouge au jaune si la bactérie utilise la voie oxydative en présence de glucose et un tube en anaérobie (couche d'huile de paraffine empêchant la diffusion de l'air) qui subit le même changement de couleur si la bactérie utilise la voie fermentative.

Composition du MEVAG adapté aux souches marines:

Extrait de viande	15 g
KCl	3 g
NaCl	5 g
Agar	3 g
Rouge de phénol.(Sigma).....	0,01 g
Eau distillée	100 ml

Ajuster le pH à 7,4.

Faire fondre l'agar.

Autoclaver

Ajouter le glucose dans la gélose liquide à 50°C pour obtenir une concentration finale de 1%.

✧ Type respiratoire

Ces caractères (aérobie strict, aéro-anaérobie facultatif...) sont étudiés sur milieu semi-solide (6‰) Viande-Foie en tube de faible diamètre (Pasteur diagnostic, réf. 64564).

- Galerie API 10 E

Une galerie API 10E (Laboratoire Bio-Mérieux, Réf: 10100) se présente sous forme d'une série de 10 cupules dans laquelle est déposé une suspension bactérienne (parcelle de culture bactérienne récente sur gélose mise en suspension dans de l'eau de mer artificielle stérile). La lecture se fait à 24 et 48 heures (choix personnel de lecture standardisée) d'incubation à 21°C.

◇ Action sur les glucides

- ONPG

Cette réaction permet la recherche de la beta-galactosidase.

- VP (Voges-Proskauer)

La réaction est positive lorsqu'il y a production d'acétoïne à partir du pyruvate.

◇ Production d'enzymes

- ADH, LDC, ODC

Ces tests permettent respectivement la recherche de l'arginine-dihydrolase, de la lysine-décarboxylase et de l'ornithine-décarboxylase.

- Citrate de Simmons

Ce test met en évidence l'utilisation du citrate de sodium comme seule source de carbone.

- Uréase

Ce test met en évidence l'utilisation de l'urée.

- H₂S

La production d'H₂S à partir du thiosulfate de sodium est soulignée par l'apparition d'un sulfite métallique noir par combinaison avec un sel de fer.

- TDA

Ce test met en évidence la présence de tryptophane-désaminase.

- Production d'indole

Ce test met en évidence la production d'indole à partir du tryptophane.

* *L'exploitation des données*

- Nomenclature des souches testées

La première lettre du nom d'une souche désigne le milieu à partir duquel elle a été isolée: M pour MA et T pour TCBS.

Les autres lettres caractérisent le prélèvement:

- ME et TE: Eau d'élevage larvaire
- MB etTB: Broyat de larves
- MBN et TBN: Broyat de Naissain en absence de mortalité
- MBM et TBM: Broyat du même naissain en phase de Mortalité au Boutillon en juillet 96
- MMPC et TMPC: Mortalité des survivants de ce même naissain testés en bacs de Pathologie expérimentale, prélèvement C = n°3
- MSM et TSM: autre naissain ayant subi des Mortalités à sa Sortie en nurserie

- Logiciel de classification des souches, CLASH

Le logiciel CLASH (Classification AScendante Hiérarchique, ©Aquacop) permet d'effectuer une taxonomie numérique des différentes souches à partir des tests de caractérisation phénotypique réalisés, sur la base du principe adansonien de classification (Colwell and Austin, 1981). Les distances calculées (coefficient de similarité de Jaccard) entre les individus sont schématisée sur un dendrogramme qui permet de visualiser ainsi les taxons ou groupes constitués.

- Le logiciel d'identification, Bactus

✧ Le logiciel

Un programme informatique d'identification des souches bactériennes a été mis au point à la station de l'IFREMER de Tahiti: Bactus (©Aquacop; Castel,1989).

Le programme permet l'identification des bactéries à partir d'une grille de cent caractères. Les caractères prennent les valeurs (+), (-) ou 0 selon que le caractère est observé, absent ou indéterminé. Les caractères des bactéries entrées en références peuvent prendre la valeur (v), pour variable.

Le principe d'identification peut se schématiser de la façon suivante: on recherche la famille à laquelle appartient la bactérie à identifier, une bactérie appartenant à une famille si et seulement si elle possède tous les caractères (notion de filtre). Dans le cas où un caractère n'a pu être déterminé, Bactus le considère comme vérifié. Si aucune famille n'est trouvée, l'identification a échoué. Quand la famille a été déterminée, l'identification se poursuit au genre, puis à l'espèce selon une procédure identique. Pour chaque identification est calculé un coefficient de similitude et le nombre de caractères comparés est annoncé.

✧ La base de références

La constitution d'une liste de bactéries de référence en vue de l'identification des germes isolés du milieu marin s'est fait selon les critères suivants: la liste des micro-organismes marins établie par Austin B. (1988), la liste des bactéries impliqués dans des processus pathologiques des organismes marins, Roberts (1978) et Austin *et al.* (1987).

Parmi les ouvrages de référence en matière de taxonomie des bactéries, notre choix s'est porté sur le "Bergey's manual of systematic bacteriology" (1984) et le "manual of clinical microbiology", Lennette (1985).

Les délais relativement longs nécessaires à l'élaboration puis à l'édition de ces manuels limitent l'actualité de leur mise à jour. Certains groupes de bactéries sont régulièrement revus

dans leur description, Baumann *et al.* (1983), Baumann *et al.* (1984), Mac Donell *et al.* (1985). c'est pourquoi nous avons utilisé quelques publications ultérieures à la date de parution de ces ouvrages de référence en complément, Schiewe *et al.* (1981), Love *et al.* (1981), Guérinot *et al.* (1982), Hickman *et al.* (1982), Tison *et al.* (1983), Yang *et al.* (1983), Hada *et al.* (1984), Brayton *et al.* (1986), Egidius *et al.* (1986), Pujalte *et al.* (1986), Nishimura *et al.* (1986), Garcia *et al.* (1987).

Le nombre important d'articles traitant du genre *Vibrio* peut s'expliquer par le double fait que : les limites taxonomiques du genre ne sont pas aujourd'hui définies (Gilmour, 1977; West *et al.*, 1986) et que ce genre a retenu plus particulièrement notre attention puisque fréquemment impliqué dans les processus pathologiques.

II.1.2) Résultats

* L'identification des souches

Le genre *Vibrio* regroupe les bacilles mobiles, Gram négatifs, aéro-anaérobie facultatifs, possédant une oxydase et fermentant le glucose; 51 souches ont été identifiées au genre *Vibrio* à partir de ces caractères.

Le genre *Photobacterium* est très proche du genre *Vibrio*, la seule différence notable à partir de caractères identifiés est l'absence de flagelle engainé dans le genre *Photobacterium*. 1 souche a été identifiée à ce genre.

Genre	espèce	total espèce	total genre	%
<i>Vibrio</i>	<i>anguillarum</i>	29	51	98
	<i>alginolyticus</i>	14		
	<i>tubiashii</i>	2		
	<i>sp.</i>	8		
<i>Photobacterium</i>	<i>sp.</i>	1	1	2

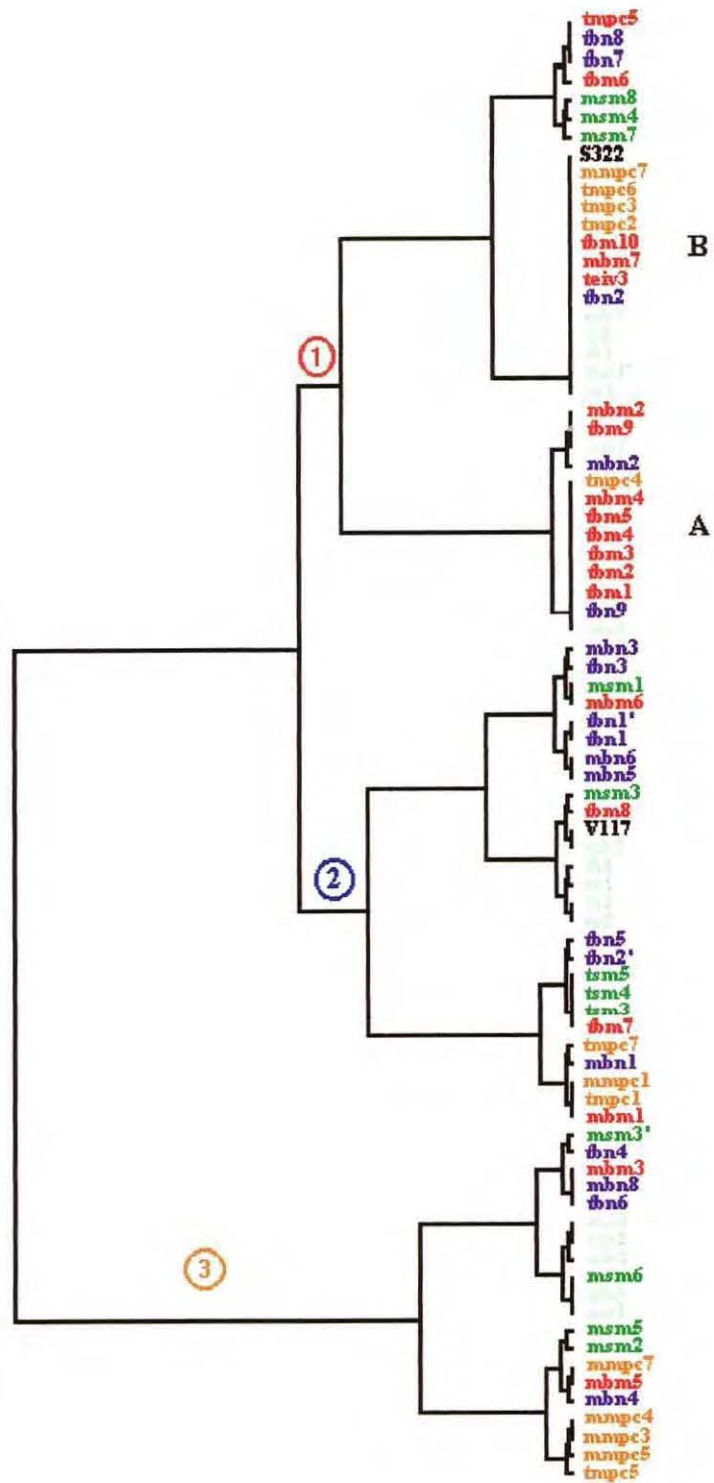
* La taxonomie numérique

- Le dendrogramme global

Cf document page 20

Le dendrogramme global regroupe toutes les souches des deux autres dendrogrammes. Il se divise en 3 groupes distincts numérotés sur la figure et qui correspondent approximativement à des genres ou des espèces différentes données par le logiciel Bactus.

Représentation du dendrogramme global :



- Le dendrogramme du suivi d'élevage

Cf document page 22

Ce document a été particulièrement utile pour la détermination des souches à tester en pathologie expérimentale.

Il se subdivise en 3 groupes.

Dans le groupe 1, un ensemble de souches identiques (A) apparaît, lié à l'épisode de mortalité sur le naissain. Ce sous groupe a fait l'objet de nombreux essais en pathologie expérimentale.

Dans ce même groupe, le sous groupe (B) est apparu quand nous avons pu compléter le dendrogramme avec les souches isolées à partir du naissain mort en induction de mortalité. Nous ne l'avons donc exploré que plus tardivement.

- Le dendrogramme de la comparaison de deux naissains ayant subi une mortalité

Cf document page 23

Ce dendrogramme permet de comparer les flores bactériennes de deux naissains d'origine différente au moment d'un épisode de mortalité.

Cette figure permet de montrer que les souches du deuxième naissain (en vert) ne concordent pas avec celles du naissain étudié lors du suivi d'élevage au moment des mortalités.

II.2) L'induction de la mortalité

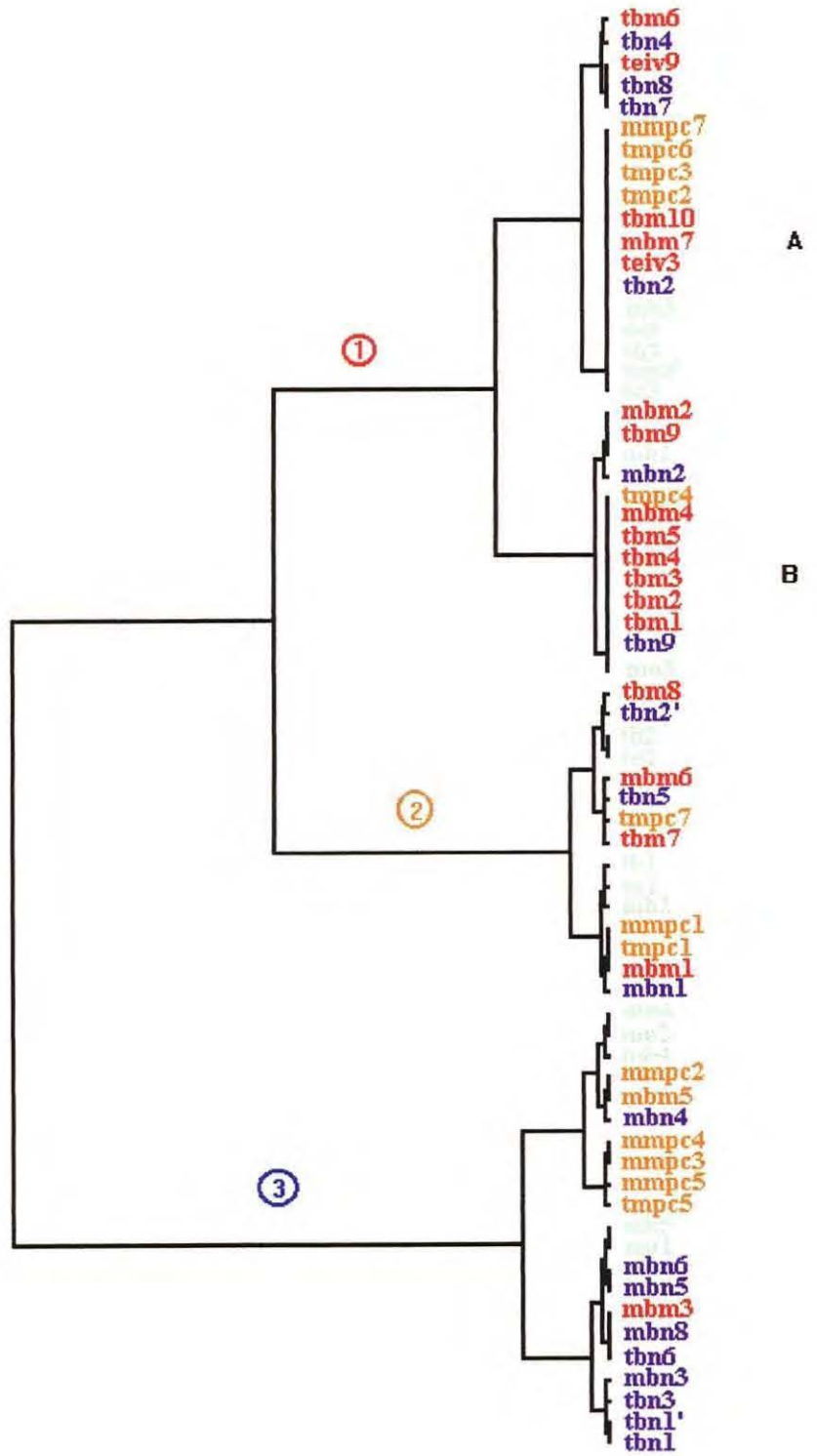
II.2.1) Matériel et méthode

** Les lots testés*

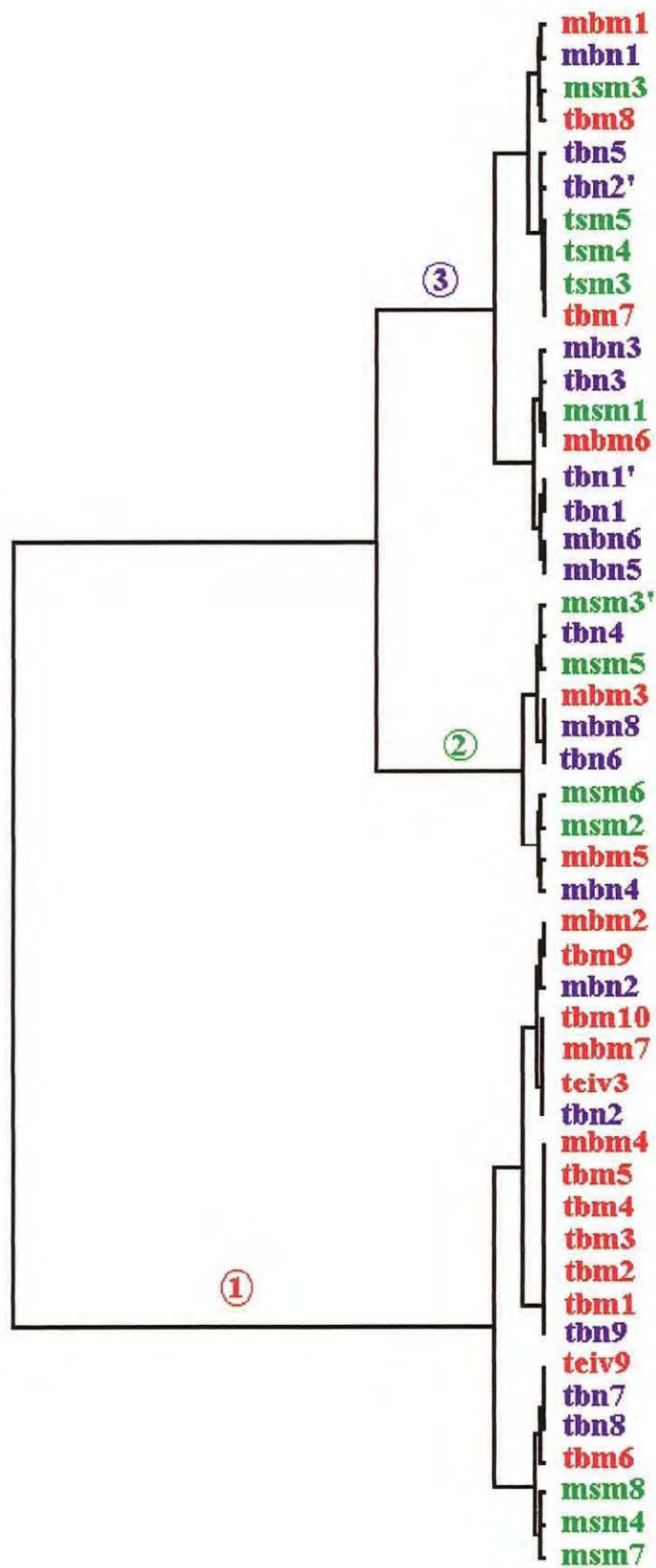
Des prélèvements ont été effectués sur deux naissains d'une même ponte (août 95) faite à partir de géniteurs d'une lignée qui n'a jamais subi de mortalité depuis 2 générations. Les géniteurs se trouvaient en lanterne au milieu de naissain en pleine mortalité sans subir de mortalité significative.

Un prélèvement est effectué avant la mise en eau des naissains et constitue le "point 0" de la manipulation. Ce "point 0" permet de connaître la flore bactérienne d'origine du lot. Par comparaison avec la flore au moment d'une éventuelle mortalité, nous pourrions savoir quelle population bactérienne s'est développée préférentiellement.

Représentation du dendrogramme du suivi d'élevage :



Représentation du dendrogramme de la comparaison de deux naissains ayant subi une mortalité :



Les dates des prélèvements sont:

- **Le 23 04 96, (lot 2A)** dit "petit" est resté en micro-nurserie jusqu'en mars et n'a donc pas été en mer avant la date du prélèvement.

- **Le 02 05 96, (lot 2B)** dit "grand" se trouvait en mer près d'un lot ayant subi des mortalités en 95.

- **Le 12 07 96, prélèvement (lot 5)** sur les survivants du naissain qui a subi la mortalité au Boutillon en juillet 96. Trois prélèvements ont été effectués : le premier le 17 07 96 en absence de mortalité (**lot 5A**), le deuxième le 18 07 96 avec un taux de mortalité de 11% (**lot 5B**) et le troisième le 19 07 96 avec un taux de mortalité de 58,7% (**lot 5C**).

** Les protocoles utilisés*

L'induction de mortalité s'effectue par augmentation progressive de la température jusqu'à 25°C, la pathologie se développant en période estivale.

Le naissain est placé dans des bacs en résine polyester de 50 litres, sans renouvellement d'eau, avec un système de bullage et un apport en phytoplancton 2 fois par jour. Le nettoyage des bacs se fait par siphonage. La température, le type d'algue et la mortalité sont notés chaque jour.

A chaque lot testé est associé un lot témoin qui, pour des raisons techniques n'a pu être maintenu à une température inférieure à 18 °C. Il a néanmoins pu être maintenu à une température inférieure au lot testé (< 25°C).

II.2.2) Résultats

** La mortalité induite*

- Expérience sur le naissain n'ayant subi aucune mortalité

Le **lot 2A** est resté en bacs d'expérimentation pendant 3 mois à 25°C sans subir de mortalité.

Le **lot 2B** est resté 3 mois dans les bacs à 25°C sans subir de mortalité notable.

Ce naissain, issu de géniteurs n'ayant jamais subi de mortalité significative même en contact avec des animaux en forte mortalité sur filières, se sont avérés indifférents à la montée en température jusqu'à 25 °C pendant trois mois.

Les animaux ont blanchi, leur coquille s'est fragilisée et leur croissance s'est stoppée mais aucune mortalité significative n'a pu être observée.

- Expérience sur le naissain survivant suite à l'épisode de mortalité

Le naissain du **lot 5** a subi des mortalités totales une semaine après sa mise en eau.

Le naissain du bac monté en température a commencé à subir des mortalités massives (58,7%) le 19 07 96, c'est à dire une semaine exactement après la mise en eau, à une température de 26°C.

Le lot "témoin" a commencé à subir des mortalités 24 heures après le lot monté en température. Ces mortalités se sont avérées moins fortes (4% le 20 07 96, 25,5% le 21 07 96, 35,6% le 22 07 96) et plus progressives.

** L'identification des souches*

Les souches bactériennes isolées à partir des prélèvements du points 0, pour les expériences d'induction de la mortalité des lots 1A et 1B, ont été mis en tubes de conservation sans être identifiés étant donné l'absence de mortalité induite.

Le point 0 du **lot 5** n'a pu être effectué. Le dernier des trois prélèvements du lot 5, (**lot 5C**) a fait l'objet d'une étude bactériologique ce qui nous a permis d'inclure les souches isolées dans le dendrogramme du suivi d'élevage. Ce prélèvement est apparu comme le plus intéressant car effectué à un taux de mortalité de 58,7%. Seules les souches de ce prélèvement sont identifiées.

Genre	espèce	total espèce	total genre	%
<i>Vibrio</i>	<i>anguillarum</i>	5	9	69
	<i>alginolyticus</i>	3		
	<i>sp.</i>	1		
<i>Pseudomonas</i>	<i>sp</i>	4	4	31

Le genre *Vibrio* regroupe les bacilles mobiles, Gram négatifs, aéro-anaérobie facultatifs, possédant une oxydase et fermentant le glucose; 9 souches ont été identifiées au genre *Vibrio* à partir de ces caractères.

Le genre *Pseudomonas* regroupe des bacilles Gram négatifs, aérobies stricts, non fermentaires, possédant une oxydase et mobile par un flagelle polaire; 4 souches ont répondu à cette définition de genre.

II.3) L'étude bactériologique complémentaire pour la recherche de bactéries pathogènes du genre *Vibrio*.

II.3.1) Choix des souches à tester

Le choix est fait à partir du dendrogramme du suivi d'élevage incomplet car au moment de l'expérience présentée ci-dessous, les souches de l'induction de la mortalité n'étaient pas encore identifiées. Les souches sont choisies dans le groupe de ME3 car cette souche a induit de la mortalité dans toutes les expériences précédentes où nous avons pu obtenir des résultats partiels. La souche TEIV9 est utilisée comme témoin négatif. La souche S322 sert de témoin de pathogénicité.

II.3.1) Etude de la pathogénicité des souches

* Matériel et méthode

- Les larves

Les caractéristiques des larves utilisées au cours des expérimentations sont les suivantes:

- espèce : *Crassostrea gigas*
- origine des géniteurs : milieu naturel
- ponte : effectuée par l'équipe de l'IFREMER-Ronce-les Bains.
- Maintien des larves sous antibiotiques jusqu'à l'expérimentation : Erythromycine.
- Age des larves au moment de l'inoculation des bactéries : 5 jours.

La ponte est réalisée de manière conventionnelle par scarification des gonades et fécondation en respectant un taux de 100 spermatozoïdes par ovule et un temps de contact entre les gamètes de 30 mn.

L'élevage larvaire est mené dans des bacs cylindrocôniques de 150 litres à une densité de 10 larves par ml. L'eau d'élevage provient d'une cuve de 300 m³ qui, après passage sur un filtre à sable est filtrée sur un filtre à cartouche de 3 µm. La salle d'élevage est thermostatée à 24,5°C.

Les larves sont nourries avec une quantité d'algues unicellulaires (spécialement cultivées pour l'élevage larvaire) de 60 cellules par µl.

Le jour de la réinfestation, les larves sont filtrées, rincées et distribuées à raison de 100 ml dans des fioles de culture cellulaire de 250 ml (Nunclon, réf.: 147589), la densité ayant été ajustée à 20-30 larves par ml.

- Les souches bactériennes

Dans un premier temps, une expérience a été faite sur la souche S322 de J.L. Nicolas afin d'adapter la quantité d'inoculum à notre protocole.

Par la suite, 10 souches choisies à partir du dendrogramme du suivi d'élevage total ont été testées.

◇ souche de référence

- S322, isolée à partir de larves de *Crassostrea gigas*, souche témoin positif (+) pathogène pour les larves de *C. gigas* (collection de souches de J.L. Nicolas, IFREMER Brest)

◇ souches isolées pendant les mortalités au Boutillon en juin 96.

- TBM1
- TBM2, souche majoritaire.
- TBM4
- TBM5' (1)
- MBM4, isolée sur MA
- TEIV9, isolée à partir de l'eau inter valvaire, appartient à un groupe voisin sur le dendrogramme

✧ souche isolée à partir du naissain avant mortalité.

- TBN9, appartenant au groupe de ME3.

✧ souches isolées sur gélose MA à partir de l'eau d'élevage larvaire.

- ME3a (2)

- ME3b (2)

(1): cette souche est issue d'une culture sur gélose de TBM5 qui comportait 2 types colonies de morphologies différentes.

(2): La souche ME3 a subi le même type de phénomène que TBM5 avec l'apparition de trois colonies de morphologies différentes, ME3a, ME3b et ME3c.

✧ La préparation de toutes ces souches en vue de leur inoculation est réalisée de la façon suivante :

- repiquage sur un milieu gélosé préparé à partir du bouillon Coeur-Cerveau par addition de 15 g d'agar et de 15 g de NaCl par litre (ajustement de la salinité à 2 ‰); incubation 24 heures à 21°C.

- repiquage sur milieu liquide Coeur-Cerveau (Sanofi Diagnostics Pasteur, réf.: 64014) en tube de 5 ml; incubation de 24 heures à 21°C.

- repiquage sur le même milieu liquide, incubation à 24°C pendant 6 heures.

- centrifugation des cultures 15 mn à 4000 tr / mn.

- remise en suspension des culots dans 5 ml d'eau de mer artificielle stérile; homogénéisation.

- ajustement des suspensions à une échelle de Mc Farland de 5.

- inoculation de 0,1 ml de cette solution pour un volume d'élevage de 100 ml.

• Le déroulement de l'expérimentation

✧ t0:

Les larves sont comptées et le taux de mortalité larvaire est évalué à l'aide d'une cellule de comptage. L'observation de l'aspect et du comportement des larves permet de juger leur état de santé.

Les larves sont passées en fiole, en triplicat afin de montrer la reproductibilité d'un éventuel phénomène. Les 3 témoins permettent de suivre la viabilité des larves en absence d'inoculum bactérien.

Après inoculation, les larves sont installées en salle de pathologie à une température de 24°C, avec un bullage (pipette stérile branchée sur le système d'arrivée d'air de la salle) et nourries quotidiennement avec une culture d'Isochrysis cultivée pour l'élevage larvaire (0,5 ml par fiole).

La quantité de bactéries inoculée est évaluée par la technique suivante: 0,1 ml de la suspension bactérienne est déposée dans une boîte de Pétri, une gélose MA à 50 °C est coulée dans la boîte et homogénéisée par un mouvement tournant. Les boîtes sont laissées sous la hotte stérile le temps de leur solidification puis incubées à 24°C pendant 48 heures. Les

colonies se développent en surface et dans la gélose, ce qui facilite le comptage. La quantité de bactéries présentes dans chaque fiole est évaluée grâce au comptage de ces géloses.

◇ t 48h:

Après un contact larves-souches inoculées de 48 heures, l'eau des fioles est changée par filtration des larves sur des tamis de 60 μm . Un volume de 0,1 ml de l'eau d'élevage d'une des fioles après filtration est étalée sur des géloses TCBS, pure, et aux dilutions de 10^{-1} et 10^{-2} (2 boîtes par dilutions). La flore bactérienne des témoins est évaluée de la même façon. Les géloses sont examinées après 24 heures d'incubation à 21 °C.

Les larves et les fioles sont rincées avec une eau de mer filtrée stérile et les larves sont remises en eau dans les fioles. Le comptage et l'évaluation des mortalités est effectuée sur une des fioles si les mortalités sont comparable à celles observées dans les fioles du témoin négatif et sur 2 fioles si les mortalités paraissent anormalement élevées.

Les larves sont ensuite réinstallés en salle de pathologie expérimentale et nourries.

◇ t 72 h:

Le changement de l'eau et l'observation des larves s'effectue comme précédemment. Aucune évaluation de la flore bactérienne n'est faite à ce stade de l'expérience.

◇ t 6 j:

Les fioles ayant subi des mortalités très supérieures à celles observées dans le lot témoin sont filtrées, les larves des 3 fioles sont observées séparément puis filtrées ensemble, rincées et broyées dans un Potter. Un volume de 0,1 ml de chacune des dilutions 10^{-1} et 10^{-2} est étalé sur des gélose de TCBS, l'incubation se fait à 24°C.

L'expérience s'arrête là.

REMARQUES

- Lors de mortalité survenant avant 6 jours (taux de mortalité cumulée > 90%), les larves sont traitées comme précédemment et la flore bactérienne évaluée à ce stade sans attendre de ne plus avoir de matériel biologique à prélever.

- La filtration des larves est effectuée sous hotte stérile, avec de l'eau de mer filtrée stérile afin d'éviter les apports bactériens exogènes. Le tamis est immerger dans l'alcool à 70°, séché et rincé à l'eau de mer stérile entre chaque fiole.

- L'utilisation du seul milieu gélosé TCBS est justifiée par le fait que toutes les souches testées poussent correctement sur ce milieu avec une morphologie reconnaissable. L'utilisation de géloses MA lors d'une manipulation précédente n'a pas permis de reconnaître la souche inoculée.

* Résultats

- Tableau 2: Taux de mortalité cumulée à 48 et 72h pour chaque souche testée.

	48 H	72 H				
	fiole 1	fiole 1	fiole 2	fiole 3	moyenne	écar. typ.
ME3 A	30	91,7	76,6	97,3	88,5	10,7
ME3 B	29	92,9	80,9	79,6	84,5	7,3
S322	3,7	72	79,3	76,6	76,0	3,7
TBM1	3,8	55,9	44,7		50,3	7,9
TBM2	6,3	30			30,0	
TBM4	5,6	39,5			39,5	
TBM5	6,9	40	50		45,0	7,1
MBM4	5,8	78,8	47	87,7	71,2	21,4
TEIV9	6,8	29,8			29,8	
TBN9	8,3	49	52		50,5	2,1
Témoin	5,5	26	20,9	14,1	20,3	6,0

- Graphique

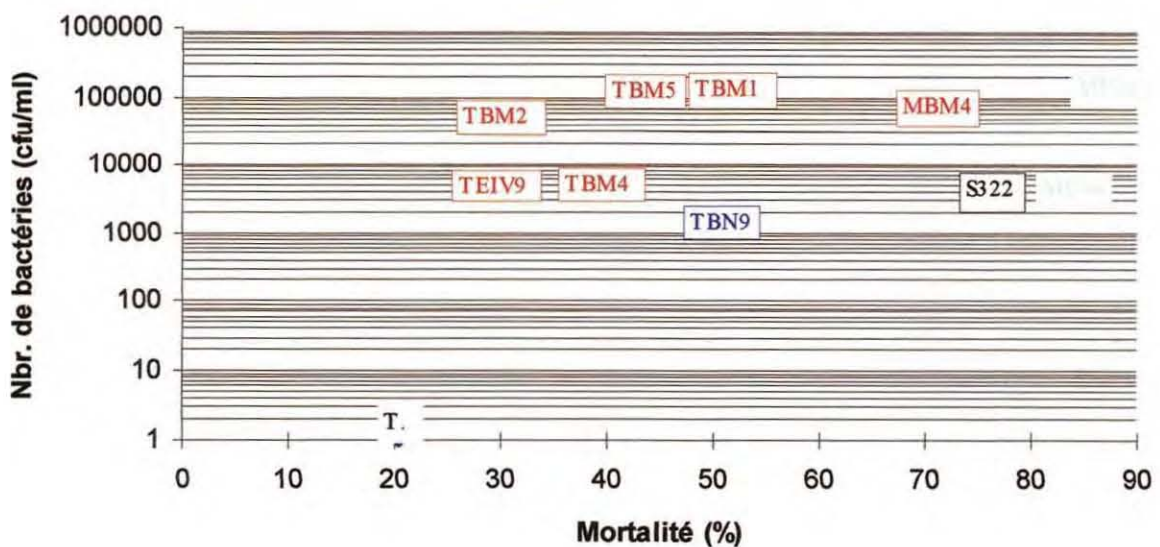


Figure 1: Corrélation entre la concentration en bactéries de l'eau d'élevage après 48 h de contact larves-bactéries et la mortalité à 72 h.

- Résumé

Les souches TBM1, TBM2, TBM4 et TBM5' peuvent être mises de côté car la concentration en bactéries à 48h est supérieure à celle de S322 alors qu'elles induisent des mortalités peu supérieures à celles du témoin et de TEIV9..

Les souches les plus intéressantes sont ME3a, ME3b et à la limite MBM4 qui sont comparables à S322.

En ce qui concerne la souche TBN9, il est bien difficile de conclure car la concentration en bactéries à 48h est beaucoup plus faible que le témoin positif

II.3.3) Utilisation des composés carbonés comme source d'énergie

* *Matériel et méthode*

Biotype 100 (Laboratoire Bio-Mérieux, réf.: 88818) est un test utilisé pour l'identification des Entérobactéries. Cet outil complète l'identification précédente qui avait pour but de faire une première sélection et de faire des regroupements entre les différentes souches. Les souches d'un même groupe sur le dendrogramme ne sont pas identiques. Biotype 100 permet donc de différencier ces souches et permet de les comparer à des souches répertoriées dans les bases de données de l'Institut Pasteur grâce au logiciel Recognizer^R afin d'effectuer une identification plus complète.

- Principe

Le Biotype 100 se présente sous la forme de 5 galeries de 20 cupules chacune et rassemble 100 tests pour l'étude de l'assimilation de différentes sources de carbone. Dans chacune des cupule se trouve un milieu ne permettant par la croissance bactérienne plus un composé carboné comme seule source d'énergie (principe de l'auxanogramme).

- Préparation de l'inoculum

Une suspension bactérienne de 5 ml est préparée à partir d'une gélose MA et ajustée à l'échelle 3 du Mac Farland Standard.

Un volume de 2 ml de cette suspension est versée dans le Biotype Médium 1 (Laboratoire Bio-Mérieux, réf.: 88819) supplémenté NaCl (2% solution finale) et en MgCl₂ (0,01% de solution finale); milieu préconisé pour les *Vibrio*

- Inoculation

A l'aide d'une pipette Pasteur montée sur un pipeteur automatique, un volume de la suspension est déposé dans les cupules afin d'obtenir une surface la plus convexe possible.

Le test est ensuite incubé à 21°C dans l'étuve.

- Lecture

La lecture s'effectue à 2 et 4 jours d'incubation. Une cupule opaque est noté positive et est affecté du jour où l'opacité a été observée. L'opacification de la suspension correspond à une croissance bactérienne.

- Identification

L'identification est faite à l'Institut Pasteur. sur le logiciel Recognizer^R (Macintosh) par comparaison à une base de donnée.

** Résultats*

- Résultats bruts

Cf Annexe 2

- Vigor des souches testées

Vigor = nombre de cupules positives en 6 jours pour une souche donnée

Cette valeur permet de savoir si une souche a plus ou moins poussée par rapport au genre *Vibrio*. La vigor d'un *Vibrio* se situe entre 20 et 30.

S322	TB2	ME3a	ME3b	TBN9	MBM4	TBM1	TBM2	TBM4	TBM5	TEIV9
32	40	23	7	31	18	26	30	31	15	35

III) DISCUSSION

III.1) Résultats de cette étude

III.1.1) Commentaires

** Induction de mortalité*

Les résultats obtenus avec le **lot 5**, sans préjuger du fait que le témoin est sensé rester vivant, laissent supposer que la température joue un rôle déterminant dans le déclenchement des mortalités.

Dans des conditions idéales où le témoin serait maintenu à une température inférieure à la température de déclenchement de la mortalité, nous aurions pu comparer les flores du lot en mortalité avec celle du lot témoin. Ces conditions n'ayant pas pu être obtenues, cette expérience nous a néanmoins permis d'observer l'évolution des mortalités en relation avec une augmentation de la température, d'effectuer des prélèvements successifs en fonction du taux de mortalité et de comparer un de ces échantillons (taux de mortalité de 58,7%) avec ceux prélevés sur le terrain au cours du suivi d'élevage.

Le dendrogramme du suivi d'élevage révèle que le groupe (A) sur lequel nous avons le plus travaillé contient une souche isolée en mortalité expérimentale. Cette souche serait intéressante à tester en reproduction expérimentale de la maladie.

Le même dendrogramme révèle aussi un autre groupe intéressant (B) où se regroupent des souches liées aux mortalités. Ce groupe est d'autant plus intéressant qu'il contient la souche S322 sur le dendrogramme total. Ces souches seraient, elles aussi, intéressantes à tester.

** Reproduction de la maladie sur larves conventionnelles*

Les souches qui se distinguent au cours de cette expérience sont essentiellement ME3b, S322 et ME3a.

Les larves inoculées avec ME3b subissent des taux de mortalité cumulée à 72h ($m_y = 84,5\%$, $\sigma = 7,3$) supérieures à celles inoculées avec S322 ($m_y = 76\%$, $\sigma = 3,7$) à concentration en bactérie à 72h équivalente.

La souche ME3a a aussi provoqué de forts taux de mortalité cumulée à 72h ($m_y = 88,5\%$, $\sigma = 10,7$) mais la forte quantité de bactéries retrouvées à 72h ($> 10^5$ CFU / ml) ne permet pas de la comparer à la souche de référence S322 ($< 10^4$ CFU / ml).

L'expérience tentée par la suite avait pour but d'affiner cette étude en testant plusieurs dilutions de l'inoculum pour obtenir des concentrations en bactéries qui permettraient de comparer ces trois souches.

D'autres souches comme TBN9 auraient été intéressantes à tester par la suite à des concentrations en inoculum différentes car les résultats obtenus ($m_y = 50,5\%$, $\sigma = 2,1$) avec une concentration en bactérie à 72h si faible ($\sim 10^3$ CFU / ml) ne sont pas interprétables.

* Identification des souches testées

Toutes les souches qui font l'objet de tests plus approfondis sont du genre *Vibrio*.

En se fiant aux tests de la fiche d'identification, les souches du groupe (A) seraient proches de *V. anguillarum* et celles du groupe (B) se rapprocheraient de *V. alginolyticus*.

Les résultats des Biotypes 100 ne sont donc pas faciles à interpréter puisque les souches n'ont pas eu la croissance escomptée.

Les 17 tests mentionnés sur la fiche d'identification bien qu'insuffisants nous ont permis de déterminer approximativement à quel genre et quelle espèce appartiennent les souches.

III.1.2) Implication de l'herpèsvirus et de bactéries dans les phénomènes de mortalité

* Analyse PCR

Des analyses PCR ont été faites sur tous les lots testés en bactériologie.

- Le suivi d'élevage

Le **lot 1A** (réf.: **96R29**), les larves prélevées hors mortalité ont été testées en PCR. Le résultat est négatif.

Le **lot 3** (réf.: **96R58**), le naissain une semaine avant les mortalités, est négatif.

Le **lot 4** (réf.: **96R61**), le naissain à 60% de mortalité, est positif (en PCR2, 6 tubes sur 13).

Le **lot 5** (réf.: **96R131**), le naissain survivant des mortalités en juin 96 a été testé. Le résultat est positif.

Des résultats positifs sont obtenus pour des mortalités déclarées (**lot 4**) et après les mortalités (**lot 5**). Les analyses étaient négatives pour les larves (**lot 1A**) et le naissain avant mortalité (**lot 3**). Les analyses PCR effectuées au cours du suivi n'ont pas eu d'utilité dans la prédiction des mortalités, elles ont permis de montrer que le virus était présent dans le naissain au moment des mortalités.

- L'induction de la mortalité

Le **lot 2A** (réf.: **96R35**) et le **lot 2B** (réf.: **96R31**), les naissains provenant de la ponte d'août 95 et ne subissant pas de mortalités ont été testés au point 0. Le résultat est négatif. Après 3 mois d'expérience, aucune mortalité n'a été observée. Aucune analyse n'a été effectuée sur ces lots en fin d'expérience.

Le **lot 5** (réf.: **96R131**), les survivants du naissain ayant subi des mortalités en juin 96 ont été testés. Le résultat est positif (6 tubes sur 6). Après 1 semaine d'expérience, un taux de mortalité d'environ 60% a été observé. Un prélèvement a été effectué pour une analyse en PCR qui sera effectuée ultérieurement.

Les points 0 ont eu une valeur prédictive pour les expériences d'induction de la mortalité: le naissain testé négatif n'a pas subi de mortalité (**lots 2A et 2B**), alors que le lot ayant subi des mortalités (**lot 5**) a été testé positif.

Ces résultats montrent une corrélation entre la détection du virus de type herpès et des épisodes de mortalités et indiquent que cet agent peut-être responsable de ces phénomènes.

* *Analyse bactériologique*

Les souches ME3a et ME3b sont peut-être pathogènes et pourraient être responsables des mortalités.

Ces souches ont été isolées à partir de l'eau d'élevage sur Marine Agar (milieu non sélectif) mais poussent également sur TCBS en 48 h à 24°C. Nous n'avons pas pu caractériser plus complètement ces souches mais il serait intéressant de compléter cette étude en explorant les bactéries proches sur le dendrogramme isolées à partir des autres prélèvements.

Il est aussi possible que des bactéries agissent en synergie avec l'herpès virus.

III.1.3) Une étude à compléter

L'étude des *Vibrio* isolés jusqu'à présent n'en est qu'à son début et ne permet pas de conclure à l'existence de bactérie franchement pathogène. Une étude menée par J.L. Nicolas (IFREMER, Brest) remet en cause la pathogénicité réelle des bactéries qu'il a testés (V110 et S322). Ainsi, la bactérie qui nous a servi de témoin positif (S322) ne serait pas forcément une bactérie très virulente.

Nous avons focalisé nos recherches sur le genre *Vibrio* mais il existe des agents pathogènes déjà connus pour leur virulence chez les mollusques bivalves dans les genres *Pseudomonas* (Brown, 1981; Colwell, 1967) et *Cytophaga/Flexibacter* (Dungan et Elston, 1988 et 1989) et que nous n'avons pas du tout exploré.

Notons que les études bactériologiques menées sur la JOD de l'huître américaine ont débuté en 1992 (Bricej *et al.*, 1992) et qu'en 1996 l'agent pathogène n'a pas encore été déterminé (Paillard *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996). Certaines études décrivent même un protiste qui pourrait être l'agent pathogène recherché (Lewis and Farley, 1996).

III.2) Difficultés liées à l'étude bactériologique en milieu marin

III.2.1) Spécificité des souches marines

* *Adaptation du matériel bactériologique*

L'utilisation du matériel de bactériologie médicale demande une certaine adaptation pour l'étude des bactéries marines. La première et évidente différence est la nécessité d'adapter les milieux de culture et de mise en suspension des bactéries marines en ajustant la concentration en chlorure de sodium (NaCl).

En ce qui concerne les milieux déshydratés, la dissolution dans de l'eau de mer artificielle (EMA) est souvent la solution la plus pratique mise à part pour les bouillons qui ont tendance à devenir troubles au moment de l'ajustement du pH.

Les problèmes commencent à se poser pour les milieux gélosés prêts à l'emploi comme les géloses Viande-Foie (VF) ou les MEVAG qui peuvent être utilisés après ajustement de la salinité. Ces milieux sont préalablement fondus et supplémentés avec une solution stérile de NaCl. Néanmoins, la solution saline a la fâcheuse tendance à se déposer au fond du tube. On obtient un milieu de culture hétérogène qui donne parfois des résultats aberrants. Le moyen le plus simple de passer outre ces problèmes est de préparer ces milieux

au laboratoire. Le milieu VF est disponible en milieu déshydraté mais en ce qui concerne le milieu MEVAG, il est plus pratique de le préparer par soi-même (Cf page 16).

En ce qui concerne les solutions pour mise en suspension des bactéries, l'emploi de l'EMA stérile à 2% est très pratique. Elle permet la dilution des suspensions bactériennes et sert de milieu pour les galeries API et les Biotypes 100.

Une adaptation des températures d'incubation est aussi nécessaire puisqu'en médecine humaine la croissance des bactéries se fait en étuve à 30°C. En bactériologie marine, l'incubation se fait à la température d'origine du prélèvement, différente par exemple pour un prélèvement d'écloserie (25-26°C) ou un prélèvement effectué en mer (15-19°C).

L'addition de milieux salés et une incubation à des températures variables posent parfois des problèmes de référence car l'emploi que nous faisons du matériel de bactériologie médicale est éloigné de son utilisation initiale.

** les références*

Les problèmes les plus ardues se sont posés pour l'emploi des galeries API et des Biotypes 100.

En ce qui concerne les galeries API, le milieu d'ensemencement utilisé, l'eau de mer artificielle stérile à 2%, est celui qui induit le moins de biais (Mc Donnell, 1982). La température d'incubation même différente de celle utilisée pour les entérobactéries ne pose pas de problème majeur puisque ce test est employé pour faire une comparaison des différentes souches isolées entre elles. Il suffit donc de fixer les paramètres d'utilisation au départ de l'étude et de garder les mêmes par la suite. Tout au long de cette étude, la lecture est fixée à 24 et 48 heures après une incubation à 24°C.

Les Biotypes 100 posent plus de problèmes car l'interprétation des résultats est faite sur un logiciel qui prévoit deux lectures à 2 et 4 jours avec une température d'incubation fixée à 30°C. Les souches testées sont comparées à des souches de référence qui ont été testées avec ces paramètres.

Le calcul de la vigor a permis de mettre en évidence des anomalies dans l'utilisation des sources de carbone de la galerie Biotype 100. Les résultats d'une souche avec une vigor trop faible (ME3b, MBM4) ne sont pas interprétables ; ils traduisent un "disconfort" de la souche (mauvaise inoculation, milieu minimum mal adapté etc...). Une vigor trop forte (TB2) traduit une contamination du test.

Cependant, le principal problème rencontré pour ce type d'identification est la mise à jour nécessaire des références du logiciel Recognizer : cette base n'est pas complète actuellement pour les Vibrionacés et doit être considérée comme un prototype. Ce système de typage en auxanogramme, s'il ne peut être utilisé comme moyen d'identification pour les souches de *Vibrio* spp., reste cependant un excellent outil de caractérisation phénotypique.

III.2.2) Variation de la morphologie des colonies au sein du genre *Vibrio*

L'observation, sur des cultures ensemencées à partir des géloses en pente, de colonies de 2 types différents a troublé plusieurs fois notre travail de recherche (Cf pages 26 et 27). Une gélose en pente est ensemencée à partir d'une colonie unique prélevée stérilement sur une gélose où cet aspect de gélose contaminée n'est pas observé. Nous avons testé les souches afin de savoir si ces colonies de morphologie différentes étaient identiques ou distinctes. Les résultats obtenus sont difficiles à interpréter car variables.

Dans le cas de la "contamination" de la souche TBM1, les morphologies des colonies étaient très différentes. Les deux types colonies, appelées TBM1 et TBM1', diffèrent par la taille bien supérieure et l'aspect crémeux de TBM1 par rapport à TBM1' qui apparaît translucide. Les galeries API 10E et "maison" montrent que ces souches étaient pourtant identiques.

Dans le cas de la souche ME3, la gélose comportait 3 types de colonies, ME3a, ME3b, ME3c:

- ME3a est plus opaque que ME3b.
- ME3c est plus petite et apparaît verte sur TCBS alors que ME3a et ME3b sont

jaunes.

Les mêmes tests que précédemment montrent que ME3b et ME3c sont identiques et diffèrent de ME3a par le test à la gélatinase: ME3b et ME3c sont gélatinase + (tests "maison") alors que ME3a est gélatinase -.

En ce qui concerne la souche TBM5, les 2 colonies, TBM5 et TBM5' sont seulement d'opacité différente. Les tests montrent que ces souches sont complètement distinctes.

La coloration de Gram révèle pour toutes ces souches une variabilité de l'intensité de la coloration et de la morphologie des bactéries sur un même frottis.

Ces tests tendent à penser qu'une contamination a eu lieu alors que les encensemencements sont effectués stérilement et à partir d'une seule colonie. En fait il n'en est rien.

Une étude très intéressante a été menée à propos des variations morphologiques des colonies bactériennes pour des souches de *V. anguillarum* et de *V. ordalii* (Austin, 1996), agents de la vibriose des salmonidés.

Les souches testées (24 souches) se différencient en 3 types de colonies sur gélose Tryptone-Soja Agar supplémentée avec 1% de sodium (TNA) et sur Marin Agar.

Ces types différents s'accompagnent de colorations de Gram d'intensité variable avec des bactéries de morphologies différentes sur un même frottis.

Les tests effectués sur galerie API 20E ont révélés que les souches étaient identiques sauf pour certaines colonies pour lesquelles l'activité de la gélatinase manquait.

Les tests de pathogénicité ont révélés une variation de la virulence en fonction des types de colonies.

Par conséquent, le choix des colonies à isoler à partir de la gélose d'ensemencement en fonction des différences morphologiques, induit un biais initial. Ce type de choix peut en effet pousser à choisir plusieurs fois la même souche et à laisser de côté une souche différente de morphologie identique. La découverte de ce phénomène est difficile à gérer car le seul moyen dont nous disposons pour choisir les colonies que de se fier à leur morphologie sur la gélose d'ensemencement

III.3) Difficultés rencontrées en pathologie expérimentale

III.3.1) L'induction de la mortalité

Le principal problème technique rencontré lors de l'induction de la mortalité est le maintien des témoins à une température inférieure à la température déclenchant la mortalité. La température idéale pour avoir un lot témoin digne de ce nom est 15°C alors que la température dans ces bacs étaient de 18-22°C pour les lot 2A et 2B et à 23-24°C pour le lot 5. La température de l'eau des bacs témoins est actuellement régulée par la température à l'intérieur de la salle de pathologie expérimentale. Cette salle devant rester fermée pour éviter de contaminer les autres salles du laboratoire, la régulation de la température n'est pas possible.

Le problème se pose quand la température de certains bacs est montée grâce à des résistances alors que d'autres doivent rester à des températures très basses : les expériences d'induction de la mortalité demanderaient donc une régulation de la température bac par bac par un système de thermostats.

III.3.2) L'étude de la pathogénicité des souches

Mise à part l'expérience de reproduction de la mortalité présentée p 26 qui permet de récolter quelques informations à propos de la pathogénicité des souches isolées, tous les autres essais se sont avérés infructueux.

Les premières inoculations sont faites avec un bouillon Coeur-Cerveauensemencé avec les souches S322, V117, V110 (3 souches de la collection de J.L. Nicolas), *V. turbot* (*Vibrio* sp pathogène pour les larves de turbot) et *V. mytili* (souche de référence) choisies respectivement comme témoin négatif et souche potentiellement pathogène, TBM2, TEIV9, ME3, TB2, TBM7, souches choisies à partir du dendrogramme du suivi d'élevage incomplet (sans les mortalités du naissain en pathologie expérimentale) avec à la fois des souches de l'élevage larvaire et des mortalités de juin 96

La première expérience, sur des larves axéniques préparées selon la méthode de Langdon (Le Deuff *et al.*, 1994; Douillet et Langdon, 1993), n'a pas été prise en compte car les larves étaient en majorité anormales.

La deuxième devait être tentée sur des larves axéniques mais celles-ci ne se sont pas développées. A la place, nous avons inoculé des larves conventionnelles d'huîtres plates, *Ostrea edulis*, issues d'une ponte faite à l'IFREMER de Ronce-les-Bains. Les mortalités obtenues étaient intéressantes et parfois surprenantes mais la quantité de bactéries inoculées n'a pu être estimée car les comptages étaient aberrants. Des mortalités totales ont été observées après un temps de contact larves-bactéries de 24 heures pour la souche ME3 et des mortalités de 60% pour les souches TBM2, TEIV9 et *V. turbot*. Le témoin inoculé avec le même volume (0,1 ml) de bouillon Coeur Cerveau non inoculé n'a pas subi de mortalité significative.

Les deux expériences suivantes ont été tentées sur des larves conventionnelles (non axéniques) identiques à celles du protocole page 26 avec le même type d'inoculum que précédemment. A chaque fois, le témoin négatif a subi des mortalités totales en 24 heures avec apparition d'un important trouble dans l'eau d'élevage. Ce trouble est très vraisemblablement dû au développement de bactéries déjà présentes sur les larves utilisées, qui, dans la quantité pourtant très faible (0,1 ml) de bouillon Coeur-Cerveau, se sont

développées. La seconde hypothèse, moins probable, est un effet toxique direct du bouillon Coeur-Cerveau sur les larves.

La cinquième expérience a été tentée avec un inoculum constitué d'une solution bactérienne (colonies prélevées à partir d'une gélose Coeur-Cerveau incubée 24 h à 24°C, dissoute dans de l'eau de mer stérile). Aucune mortalité n'a été observée. Les facteurs de pathogénicité, comme les pili qui permettent l'adhésion de la bactérie à la surface des tissus vivants, apparaissent en effet plus facilement en milieu de culture liquide, cette expérience a eu le mérite de nous le rappeler.

La sixième expérience a été tentée avec S322,, pathogène pour les larves d'huîtres creuses en s'inspirant du protocole de J.L. Nicolas que nous venions de recevoir. L'inoculum a été obtenu par centrifugation du bouillon Coeur-Cerveau (4000 tr/mn, 15 mn) et remise en suspension du culot dans des tubes de 5 ml de l'eau de mer stérile. Nous avons inoculé des fioles avec trois dilutions de cette suspension afin d'adapter sa méthode à notre protocole. Nous avons obtenu des résultats intéressants pour cette souche mais nous n'avons pas pu l'adapter aux autres souches. Chaque souche a en effet une vitesse de croissance et une correspondance entre la concentration en bactéries et la turbidité de la suspension (mesurée sur une échelle de Mac Farland) qui lui est propre.

En ce qui concerne les deux expériences suivantes, les témoins négatifs ont subi une mortalité de 90% en 48 h.

La neuvième expérience est la seule à avoir donné des résultats intéressants et exploitables (page).

La dixième expérience a été tentée pour préciser le seuil de pathogénicité de souches sélectionnées au cours de l'expérience précédente, S322, ME3b et ME3a et de souches retenues à partir du dendogramme total, TEIV3, à cause de ses caractéristiques et de sa morphologie identique celles de S322, MMPC7, souche identique à S322 sur le dendogramme, prise au hasard. L'expérience a été tentée en dernier lieu malgré la difficulté d'obtenir des larves viables. Les témoins négatifs ainsi que l'élevage dont elles étaient issues ont subi des mortalités importantes (90% en 48 h pour les larves testées).

Dix expériences de reproduction de la maladie ont été tentées, 2 seulement ont pu être interprétées. Les résultats obtenus sont ainsi très partiels et incomplets.

Le protocole que nous avons utilisé fonctionne bien mais demande quelques améliorations, notamment l'installation d'un bain thermostaté à 24-25°C pour les fioles de larves en salle de pathologie expérimentale.

Le principal problème rencontré est la production de larves viables qui ne meurent pas pendant les expériences.

III.3.3) Les problèmes posés par l'expérimentation sur les mollusques bivalves

Un autre problème, plus général, est celui de l'éloignement des conditions d'expérimentation par rapport à l'environnement naturel de ces animaux. Ce problème s'est posé plusieurs fois au cours des expériences et est à mettre en relation avec le débat qui s'engage actuellement entre chercheurs (Paillard *et al* 1996) à propos du comportement de l'espèce *Crassostrea* face aux conditions subies en pathologie expérimentale.

Le naissain mis en bacs sans renouvellement d'eau pour des expériences de longue durée n'effectue aucune pousse et se met en métabolisme ralenti, alors que les mortalités apparaissent sur des animaux en pleine croissance avec un métabolisme élevé. Par exemple, le lot 2A qui a arrêté sa croissance 2 semaines après sa mise en eau dans les bacs de 50 litres et n'a jamais présenté de nouvelle pousse pendant les 3 mois d'expérimentation. Une semaine après son transfert en quarantaine, où le naissain bénéficie d'un renouvellement d'eau périodique et d'une alimentation en algues unicellulaires en continue, nous avons pu observer l'apparition d'une "dentelle de croissance".

CONCLUSION

Les résultats obtenus sont partiels mais cette étude devrait d'être poursuivie afin d'explorer cette possibilité d'affection par un agent bactérien. Nous avons réussi à induire une mortalité à plusieurs reprises en inoculant la souche ME3 notamment au cours d'une expérience de reproduction de la maladie sur larves conventionnelles où elle avait une pathogénicité comparable à celle de S322. Les résultats obtenus en PCR sont très intéressants car les prélèvements ont été nettement positifs pour la première fois sur des prélèvements de Grainocean. Cependant, l'étude bactériologique n'étant pas terminée, rien ne permet de conclure que l'herpès ou la bactérie isolée puisse l'un ou l'autre être le seul responsable des mortalités. Il serait sûrement intéressant d'étudier le rapport entre ces deux types d'agents.

Cette étude comportait quelques difficultés inévitables à la pathologie elle-même: les mortalités sont apparues en juin, ne laissant qu'une courte période (3 mois) pour l'identification des souches les plus intéressantes, le regroupement informatique, les antibiogrammes, les Biotypes 100 et surtout la pathologie expérimentale qui a posé de gros problèmes d'ordre pratique (larves non viables) et fait perdre beaucoup de temps.

A ce manque de temps déjà évident, s'est ajouté le fait que le laboratoire de bactériologie n'existait pas encore à l'IFREMER de Ronces-les-Bains et qu'il a fallu tout installer de la salle d'étude au programme informatique.

Cette étude ne prouve pas que nous avons découvert une bactérie pathogène car l'étude d'une maladie n'est pas aussi simple comme pouvaient le faire croire certaines publications incomplètes (Haskell et Tubiash, 1970; Bolinches, 1986), et l'isolement de bactéries connues pour leur pathogénicité sur les organismes marins comme *Vibrio anguillarum*, *tubiashii* ou *alginoliticus* ne suffit pas à prouver qu'elles sont à l'origine d'une pathologie. De plus, il existe actuellement des difficultés de correspondance entre les différents types d'identification des bactéries (typage moléculaire, identification biochimique...) rendant parfois difficile le rattachement une bactérie isolée lors d'une étude à un genre et une espèce précise (Nicolas *et al.*, 1996). Cette étude permet simplement d'initier une recherche sur la mortalité estivale des juvénils d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, complémentaire de l'hypothèse d'une infection virale.

BIBLIOGRAPHIE

- Austin, B., Alsina, M., Austin, D.A., Blanch, A.R., Grimont, F., Grimont, P.A.D., Jofre, J., Koblavi, S., Larsen, J.L., Pedersen, F., Tiainen, T., Verdonck, L. and Swings, J. (1995) Identification and typing of *Vibrio anguillarum*: a comparison of different typing methods. *System. Appl. Microbiol.* 18:285-302.
- Austin, B., Austin, D.A., Falconer, V.M., Pedersen, K., Larsen, J.L., Swings, J., and Verdonck, L. (1996) Dissociation of *Vibrio anguillarum* and *V. ordalii* cultures into two or three discrete colony types. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 16:101-103.
- Bolinches, J., Toranzo, A.E., Silva, A., Barja, J.L. (1986) Vibriosis as the main causative factor of Heavy mortalities in the oyster culture industry in Northwestern Spain. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 6:1-5.
- Bricelj, V.M., Ford, S.E., Borrero, F.J., Perkins, F.O., Rivara, G., Hillman, R.E., Elston, R.A., and Chang, J. (1992) Unexplained mortalities of hatchery-reared, juvenile oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Shell. Res.* 11:331-347.
- Brown, C. (1973) The effects of some selected bacteria on embryos and larvae of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Invertebr. Pathol.* 21:215-223.
- Brown, C. (1981) A prodiginine pigment toxic to embryos and larvae *Crassostrea virginica*. *J. Invertebr. Pathol.* 38:281-293.
- Brown, C. (1981) A study of two shellfish pathogenic *Vibrio* strains isolates from a Long Island hatchery during a recent outbreak of disease. *J. Shell. Res.* 1:83-87.
- Colwell, R.R. and Sparks, A.K. (1967) Properties of *Pseudomonas enalia*, a marine bacter pathogenic for the invertebrate *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Appl. microb.* 15:980-986.
- Colwell, R.R. and Austin B. (1981) Numerical taxonomy (chapter 21). From *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for microbiology, Washington.
- Davis, C.V. and Barber, B.J. (1994) Size-dependent mortality in hatchery-reared populations of oysters, *Crassostrea virginica*, Gmelin 1791, affected by juvenile oyster disease. *J. Shell. Res.* 13:137-142.
- Douillet, P. and Langdon, C.J. (1993) Effects of marine bacteria on the culture of axenic oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) larvae. *Biol. Bull.* 184:36-51.

Dungan, C.F. and Elston, R.A. (1988) Histopathological and ultrastructural characteristics of bacterial destruction of the hinge ligaments of cultured juvenile Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 72:1-14.

Dungan, C.F., Elston, R.A., and Schiewe, M.H. (1989) Evidence for colonization and destruction of hinge ligaments in cultured juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) by cytophaga-like bacteria. *App. Environ. Microbiol.* 55:1128-1135.

Elston, R.A. and Leibovitz, L. (1980) Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oysters, *Crassostrea virginica*. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 37:964-978.

Elston, R., Leibovitz, L., Relyea, D., and Zatila, J. (1981) Diagnosis of vibriosis in a commercial oyster hatchery epizootic : diagnostic tools and management features. *Aquaculture*, 24:53-62.

Elston, R., Elliot, E.L., and Colwell, R.R. (1982) Conchiolin infection and surface coating *Vibrio* : shell fragility, growth depression and mortality in cultured oysters and clams, *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* and *Mercenaria mercenaria*. *J. Fish Dis.* 5:265-284.

Elston, R.A. (1984) Prevention and management of infectious diseases in intensive mollusc husbandry. *J. World Maricul. Soc.* 15:284-300.

Elston, R.A., Beattie, J.H., Friedman, C., Hedrick, R., and Kent, M.L. (1987) Pathology and significance of fatal inflammatory bacteraemia in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thünberg. *J. Fish Dis.* 10:121-132.

Fouz, B., Conchas, R.F., Bolinches, J., Romalde, J.L., Barja, J.L., and Toranzo, A.E. (1990) Relationship among pathogenic *Vibrio anguillarum* and *Vibrio tubiashii* with environmental *Vibrio*. In: *Pathology in marine science*. F.O. Perkins and T.C. Cheng, eds. Academic Press, pp. 77-89.

Grischkovsky, R.S. and Liston, J. (1974) Bacterial pathogenicity in laboratory induced mortality of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg). *Procced. of the Nation. Shellf. Ass.* 64:82-91.

Hada, H.S., West, P.A., Lee, J.V., Stemmler, J., and Colwell, R.R. (1984) *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve mollusks. *Int. J. Syst. Bact.* 34:1-4.

Jeffries, V.E. (1982) Three *Vibrio* strains pathogenics to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture*. 29:201-226.

Le Deuff, R.M., Nicolas, J.L., Renault, T., Cochenec, N. (1994) Expérimental transmission of a Herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 14:96-72

- Lee, M., Taylor, G.T., Bricelj, V.M., Ford, S.E., and Zahn, S. (1996) Evaluation of *Vibrio* spp. and microplankton blooms as causative agents of juvenile oyster disease in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Shell. Res.* 15:319-329.
- Lewis, E.J., Farley, C.A., Small, E.B., and Baya, A.M. (1996) A synopsis of juvenile oyster disease (JOD) experimental studies in *Crassostrea virginica*. *Aquat. Living Resour.* 9:169-178.
- Lewis, T.E., Garland, C.D., O'Brien, T.D., Fraser, M.I., Tong, P.A., Ward, C., Dix, T.G., and McMeekin, T.A. (1988) The use of 0.2- μ m membrane-filtered seawater for improved control of bacterial levels in microalgal cultures fed to larval pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 69:241-251.
- Lodeiros, C., Bolinches, J., Dopazo, C.P., and Toranzo, A.E. (1987) Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture*, 65:15-29.
- McDonnell, M.T., Singleton, F.L., and Hood, M.A. (1982) Diluent composition for use API 20E in characterizing marine and estuarine bacteria. *App. Environ. Microbiol.* 44:423-427.
- Murchelano, R.A., Brown, C., and Bishop, J. (1975) Quantitative and qualitative studies of bacteria isolated from sea water used in the laboratory culture of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Fish. Res. Board Can.* 32:739-745.
- Nicolas, J.L., Corre, S., Gauthier, G., Robert, R., and Ansquer, D. (1996) Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis. aquat. Org.* (In Press)
- Olafsen, J.A., Fletcher, T.C., and Grant, P.T. (1992) Agglutinin activity in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following in vivo *Vibrio anguillarum* challenge. *Dev. Comp. Immunol.* 16:123-138.
- Paillard, C., Ashton-Alcox, K.A., and Ford, S.E. (1996) Changes in bacterial densities and hemocyte parameters in eastern oysters, *Crassostrea virginica*, affected by juvenile oyster disease. *Aquat. Living Resour.* 9:145-158.
- Renault, T., Cochennec, N., Le Deuff, R.M. and Chollet B. Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 14:64-66.
- Riquelme, C., Hayashida, G., Toranzo, A.E., Vilches, J., and Chavez, P. (1995) Pathogenicity studies on a *Vibrio anguillarum* related (VAR) strain causing an epizootic in *Argopecten purpuratus* larvae cultured in Chile. *Dis. aquat. Org.* 22:135-141.
- Ruimy, R., Breittmayer, V., Elbaze, P., Lafay, B., Boussemart, O., Gauthier, M., and Christen, R. (1994) Phylogenetic analysis and assesment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bact.* 44:416-426.

Tubiash, H.S., Chanley, P.E., and Leifson, E. (1965) Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. I. Etiology and epizootiology. *J. Bact.* 90:1036-1044.

Tubiash, H.S., Colwell, R.R. and Sakazaki, R. (1970) Marine Vibrios Associated with bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *J. Bact* 103:272-273.

Tubiash, H.S. (1996) Bacterial pathogens associated with cultured bivalve mollusk larvae. In: *Culture of marine invertebrates animals*. W.L. Smith and M.H. Chanley, eds. pp. 61-71.

Annexe 1 : FICHE D'IDENTIFICATION DES BACTERIES ISOLEES

Date d'isolement :

N° d'identification :

Coloration de Gram :

Morphologie :

Mobilité :

Coloration de flagelles :

Oxydase :

MEVAG :

Gélose Viande-Foie :

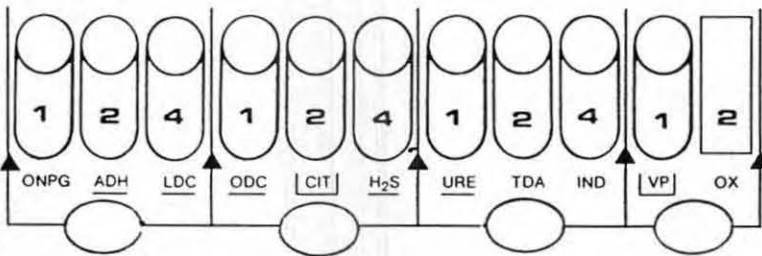
Galerie API 10 E :

api 10 E

REF. :

___ / ___ / ___

Origine/ Source/**Herkunft**/ Origen/ *Prelievo*



Autres tests/ Other tests/**Weitere Tests**/ Altri tests/ Otros tests

Ident.

Annexe 2

	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	α-D(+) Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	α-D(+) Fructose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
3	D(+) Galactose	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
4	D(+) Trehalose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
5	D(+) Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	L(+) Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	α-D(+) Melibiose	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Sucrose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
9	D(+) Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Maltotriose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	α-Lactose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Lactulose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
14	1-0-Methyl-β-galactopyranoside	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
15	1-0-Methyl-α-galactopyranoside	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	D(+) Cellobiose	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
17	β-Gentobiose	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
18	1-0-Methyl-β-D-glucopyranoside	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
19	Esculin	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
20	D(-) Ribose	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
21	L(+) Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	D(+) Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	Palatinose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
24	α-L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	α-L-Fucose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
26	D(+) Melesitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	D(+) Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	L(-) Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	D-Tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	Glycerol	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
33	myo-Inositol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
34	D-Mannitol	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
35	Maltitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	D(+) Turanose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
37	D-Sorbitol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
38	Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	Hydroxyquinoline-β-glucuronide	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	i-Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	1-0-Methyl-α-D-glucopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	3-0-Methyl-D-glucopyranose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
44	D-Saccharate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	Mucate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	L(+) Tartrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	D(-) Tartrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
48	meso-Tartrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	D(+) Malate	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
50	L(-) Malate	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

* : (1) S 322; (2) TB2; (3) ME3a; (4) ME3b; (5) TBN9; (6) MBM4; (7) TBM1; (8) TBM2; (9) TBM4; (10) TBM5; (11) TEIV9

suite

51	<i>cis</i> -Aconitate	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
52	<i>trans</i> Aconitate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	Tricarballoylate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	Citrate	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
55	D-Glucuronate	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-
56	D-Galacturonate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	2-Keto-D-Gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
58	5-Keto-D-Gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	L-Tryptophane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	N-Acetyl-D-Glucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
61	D-Gluconate	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
62	Phenylacetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	Protocatechuate	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+
64	4-Hydroxybenzoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	(-) Quinate	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+
66	Gentisate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	<i>m</i> -Hydroxybenzoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	Benzoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	3-Phenylpropionate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70	<i>m</i> -Coumarate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	Trigonelline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	Bentaine	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
73	Putrescine	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
74	4-Aminobutyrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
75	Histamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
76	DL-Lactate	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
77	Caprate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78	Caprylate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
79	L-Histidine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80	Succinate	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
81	Fumarate	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
82	Glutarate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
83	DL-Glycerate	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
84	5-Aminovalerate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
85	Ethanolamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
86	Tryptamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
87	D-Glucosamine	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+
88	Itaconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89	3-Hydroxybutirate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90	L-Aspartate	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
91	L-Glutamate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
92	L-Proline	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
93	D-Alanine	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
94	L-Alanine	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
95	L-Serine	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
96	Malonate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
97	Propionate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
98	L-Tyrosine	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
99	α -Ketoglutarate	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-

* : (1) S 322; (2) TB2; (3) ME3a; (4) ME3b; (5) TBN9; (6) MBM4; (7) TBM1; (8) TBM2; (9) TBM4; (10) TBM5; (11) TEIV9