

Caractérisation de bactéries pathogènes, *Vibrio splendidus*, isolées de Bivalves marins

M. Gay, M. Waechter, Ch. Lambert, J. M. Escoubas, N. Cochennec, J. L. Nicolas, F. Berthe et F. Le Roux

*Laboratoire de Génétique et Pathologie, La Tremblade
Laboratoire de Physiologie des invertébrés, Brest*

La production d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, est aujourd'hui la principale production française de coquillages. Le naissain mis en élevage dans les différents centres de production est généralement obtenu par captage naturel mais l'utilisation de naissain d'écloserie est en constante progression depuis quelques années, et représente aujourd'hui près de 10% du naissain mis en élevage. En période estivale, à la faveur de températures élevées, de forts taux de mortalité de naissains d'huître creuse *C. gigas* (60 à 100%) sont rapportés régulièrement depuis 1991, dans les éclosiers-nurseries ainsi qu'en milieu naturel. Au cours des cinq dernières années, ces épisodes récurrents sont apparus comme un sujet préoccupant pour l'ensemble de la profession.

Les études menées dans le but d'identifier les causes de ces épisodes de mortalité ont révélé l'existence d'un agent viral de type Herpès sur des larves et naissains d'huître creuse. Si la pathogénicité de ce virus a pu être démontrée pour les stades larvaires, la reproduction expérimentale de la maladie du naissain fait encore l'objet d'études.

De nombreuses études ont établi le caractère pathogène de certaines souches de bactéries pour diverses espèces de bivalves dont l'huître creuse. Une étude de ces bactéries associées aux épisodes de mortalité de *C. gigas* a été initiée dès 1997 au laboratoire de La Tremblade (thèse de M. Waechter). Dans une première phase, les souches bactériennes isolées lors d'épisodes de mortalité ont été caractérisées biochimiquement. Parmi ces souches, les souches pathogènes, de type *Vibrio* ont été repérées par reproduction expérimentale de la maladie. Dans une seconde phase, l'identification des souches reconnues pathogènes a été entreprise par séquençage des gènes codant pour l'ARN16S, et a été confirmée par hybridation quantitative ADN/ADN, il s'agirait d'un *Vibrio splendidus*. D'autres souches de *Vibrio splendidus* ont été associées à des mortalités chez différents animaux marins.

Aujourd'hui, nous disposons d'une collection de souches de *Vibrio splendidus* isolées de naissain ou larves de coquille Saint Jacques, turbots et huîtres. Nous avons cloné et séquencé les 16S et ITS de ces 13 souches pour une étude de phylogénie moléculaire, comparer leurs phénotypes et démarrer des expériences de reproduction expérimentale sur larves.

Nous désirons développer des outils de détection contre ces *vibrio*, caractériser la virulence des ces bactéries sur des larves et du naissain d'huîtres, étudier la pathogénèse, et optimiser les modèles de pathologie expérimentale.

VIBRIO SPLENDIDUS, pathogène ou non?

Une maladie infectieuse est le résultat d'un déséquilibre entre la virulence de l'agent infectieux et les capacités de l'organisme à se défendre...

opportunistes

Non pathogène
ne peut pas nuire à l'hôte
dépourvu de gènes de virulence

épizoïtes

Pathogène
nuît obligatoirement à l'hôte
expression constitutive des facteurs de virulence

Pathogène « conditionnel », peut nuire à l'hôte
gènes de virulence s'expriment sous certaines conditions
population d'agents infectieux à virulence variable

PATHOGENES CHEZ CRASSOSTREA GIGAS

Reproduction
Croissance
Stade de développement

C. gigas Pathogène

Environnement

Température
Salinité
Oxygène
Algues toxiques
Nourriture
Pollution

Parasites
Microcytos mackini
Haplosporidium nelsoni
Perkinsus marinus

Virus
Iridovirus
Herpesvirus ← MOREST

Bactéries
Vibrio
Cytophaga
Nocardia
Chlamydia
Rickettsia

RÉCHERCHE DE BACTÉRIES ASSOCIÉES AUX MORTALITÉS ESTIVALES (Thèse de Magali Waechter, financée par Grainocéan)

- 1- Isolement de bactéries à partir de naissain moribond (septembre 1997, 60% mortalité, naissain de captage naturel en filière en mer)**
Cytophaga, Vibrio anguillarum, V. splendidus, V. fluvialis, V. mediterranei, V. pelagius, V. nigripulchritudo
- 2- Analyse du caractère pathogène des souches par expérimentation en balnéation sur naissain**
souche TNEMF6 (*Vibrio splendidus*) pathogène. D'autres *Vibrio splendidus* ne sont pas pathogènes
- 3- Caractérisation de la souche pathogène (test biochimique; séquençage du 16S-alignement- phylogénie moléculaire; hybridation ADN/ADN)**
souche pathogène = *Vibrio splendidus* biovar II

- 4- Mise au point d'outil de détection**
Ribotypage
- 5- Epidémiologie moléculaire**
Recherche de souches proches de TNEMF6, par test biochimique, ribotypage et hybridation ADN/ADN
* 1/26 souches isolées pendant mortalité
* 0/5 souches isolées avant mortalité

6- Conclusions

Espèce *V. splendidus* très répandue
Grande biodiversité
Parmi ces *Vibrio*, certains apparaissent pathogènes

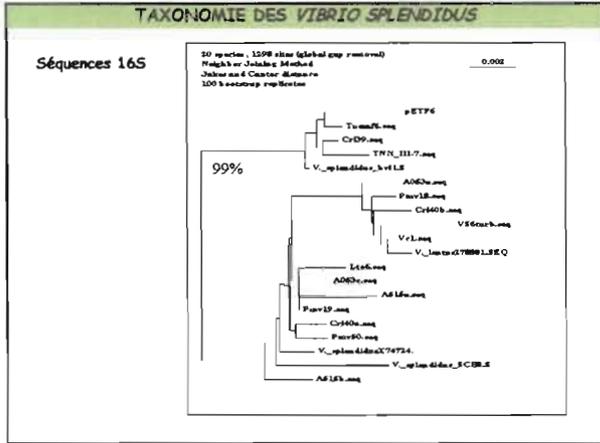
- * *splendidus* biovar II (larves et naissain, balnéation)
- * *splendidus* biovar I (naissain, injection)
- * autres mollusques et poissons

Souche TNEMF6 rare: épiphénomène ou biais d'échantillonnage?

- * animaux décoquillés
- * action des bactéries à distance (exotoxine)
- * jamais d'infection systémique dans naissain en mortalité estivale

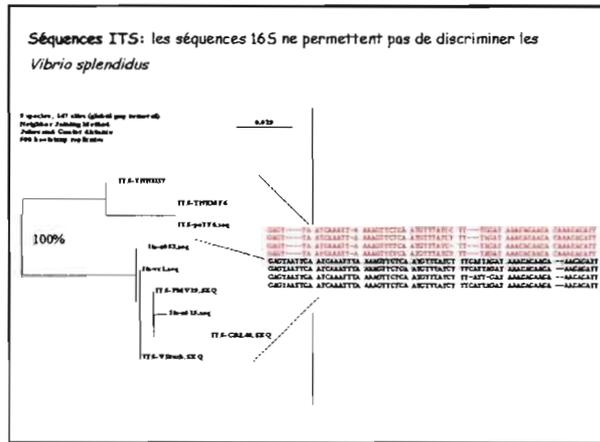
NOUVEAU PROJET

- 1- Eclaircir la **taxonomie** des *Vibrio splendidus* à partir d'une collection de souches
- 2- Mise au point d'**outils moléculaire de détection** de l'espèce
- 3- Tester **pathogénicité** sur larves et naissain de *Crassostrea gigas* par balnéation
- 4- **Modélisation** in vivo ou ex vivo de la virulence
- 5- Recherche du **support de virulence**
- 6- **Variation de la virulence** en fonction des paramètres d'hôtes et d'environnement
- 7- Mise au point d'**outils de diagnostic** dirigés contre facteurs de virulence



Hybridation ADN/ADN: on considère que des bactéries sont de la même espèce quand leurs génomes s'hybrident à plus de 70%

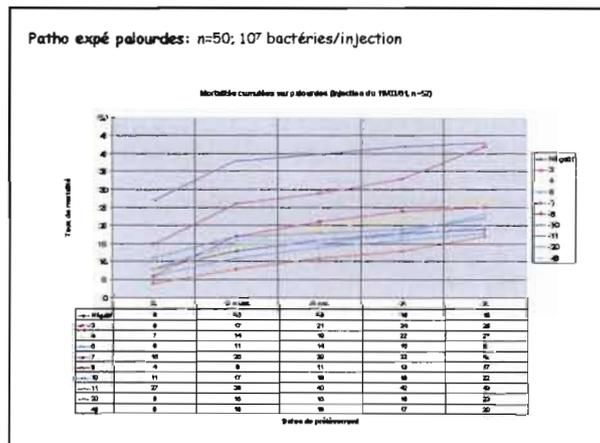
Souches	ADN de souche type <i>splendens</i> I (5)	ADN de souche type <i>splendens</i> II (6)
1	48.8%	40.3%
2	53.4%	41%
3	70.6%	39.4%
4	43.5%	36.2%
5	100%	48.2%
6	40.2%	100%
7	39.7%	71.5%
8	37%	100%
9	39.5%	101.7%
10	86.1%	44.5%
11	86%	43.9%
12	53.9%	27.8%
13	63.6%	47.3%
Anguillarum	6.3%	7.4%



VIRULENCE DES *VIBRIO SPLENDIDUS*

Patho expé larves de Gigas: n=100; 10⁴ bactéries/ml; 48h baignation

Souches	Espèce	Histoire	Test sur larves de <i>C. gigas</i>
1: VC1	<i>V. splendidus</i> 1	isolée de larves de coquille, mai 2000	-
2: A053	<i>V. splendidus</i> 1	isolée de larves de coquille, juin 1990	-
3: AS15	<i>V. splendidus</i> 1	pathogène sur larves de CSJ	-
4: V560arb	<i>V. splendidus</i> 1	isolée de larves de coquille pathogène sur larves de CSJ	-
5: CR140	<i>V. splendidus</i> 1	isolée de larves de turbot pathogène sur larves de CSJ	-
6: CR139	<i>V. splendidus</i> 1	souches de référence	-
7: TNEMF6	<i>V. splendidus</i> 2	isolé de naissain capté naturel, septembre 1997 pathogène naissain de <i>C. gigas</i>	-
8: TNM11	<i>V. splendidus</i> 2	isolé de naissain d'élevage, été 1998	-
9: pETP6	<i>V. splendidus</i> 2	isolé de patho expé par TNEMF6, 1998	-
10: LT06	<i>V. splendidus</i> 1	isolée de larves de coquille, pathogène sur larves de CSJ, 99	-
11: PMV19	<i>V. splendidus</i> 1	isolée de larves de coquille, pathogène sur larves de CSJ, 99	-
12: PMV50	<i>V. splendidus</i> 1	isolée de larves de coquille, pathogène sur larves de CSJ, 99	-
13: PMV18	<i>V. splendidus</i> 1	isolée de larves de coquille, pathogène sur larves de CSJ, 99	-



CONCLUSIONS PERSPECTIVES

- 1- Taxonomie des *vibrio splendidus*: *Vibrio splendidus* biovar II = nouvelle espèce
- 2- Actuellement des oligonucléotides nous permettent d'amplifier les ITS des *V. splendidus* I et II, spécificité reste à démontrer
- 3- Certaines souches semblent pathogènes, résultats à confirmer par baignation de naissain (en cours)
- 4- Actuellement nous disposons d'une souche virulente et non virulente pour chaque espèce *splendens* I et II

Recherche des facteurs de virulence

Activité des surnageants de culture *ex vivo*
Purification des toxines
Microséquences
Recherche des gènes supports

Soustraction génomique (Representational Difference Analysis)

	Jean Louis Nicolas Matthieu Garnier LPI, IFREMER, Brest
Mélanie Gay Magali Waechter Nathalie Cochennec Franck Berthe Frédérique Le Roux, LSP, IFREMER, la Tremblade	Christophe Lambert Gwénaëlle Choquet Christine Paillard Philippe Soudant IUEM, UBO, Brest Jean Michel Escoubas DRIM, IFREMER, Montpellier Manolo Gouy UMR CNRS 5558, Lyon