

**UNIVERSITE DE LA ROCHELLE
ECOLE DOCTORALE**

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LA ROCHELLE

Discipline : Biologie

Présentée et soutenue publiquement

Par

Mélanie GAY

Le 10 décembre 2004

**Infection expérimentale chez *Crassostrea gigas* :
étude de deux souches pathogènes apparentées à
*Vibrio splendidus***

JURY

**Mme Anne-Marie PONS
Mme Frédérique LE ROUX
M. Brian AUSTIN
M. Colin R. TINSLEY
M. Pierre MIRAMAND
M. Joël GATESOUBE**

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma reconnaissance aux membres de ce jury de thèse : à Brian Austin et Colin R. Tinsley pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail ainsi qu'à Pierre Miramand et à Joël Gatesoupe.

Je remercie Frédérique Le Roux, encadrante scientifique de cette thèse, qui m'a donné l'opportunité de travailler sur cet animal hors norme, l'huître, et qui a su me faire apprécier la biologie moléculaire.

Je voudrais adresser mes sincères remerciements à Anne Marie Pons pour avoir accepté de diriger ce travail de thèse et du coup de plonger dans le monde des huîtres. Grâce à toi, j'ai découvert que, même si ce n'est pas mon fort, la biochimie a parfois du bon...

Je tiens à remercier André Gérard et Philippe Gouletquer, directeurs successifs du Laboratoire de Génétique et Pathologie et de la station Ifremer de La Tremblade, pour leur accueil et leur soutien tout au long de cette thèse. J'exprime également toute ma reconnaissance à l'Ifremer et au Conseil Régional de Poitou-Charentes qui ont co-financé ce travail.

Une partie de ce travail a été effectuée au Laboratoire de Biotechnologies et de Chimie Bio-organique de l'Université de La Rochelle, dirigé par Marie-Dominique Legoy que je remercie pour son accueil.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux membres de mon comité de thèse pour leurs conseils et leur soutien. Merci à Jean-Louis Nicolas, Jean-Michel Escoubas, Jean-François Bernardet, Colin R. Tinsley et Tristan Renault qui avaient bravé les éléments en ce jour de janvier 2003.

Un grand merci à Jean-François Auvray, Christian Giraudeau et Yves Papin. Ils m'ont fourni des huîtres ou des palourdes pour que je puisse assouvir mes pulsions de serial killer de mollusques.

Ce fut un réel plaisir de travailler au sein de l'équipe de pathologie de La Tremblade.

Je tiens à adresser de chaleureux remerciements à Tristan Renault, il a toujours été disponible pour passer du temps à me faire découvrir les multiples secrets des huîtres, leurs organes, leurs cellules, et tant d'autres choses encore, sans parler de toutes les fois où "Tristan, je peux te poser une question??"...

Qu'aurait été ce travail sans l'équipe Répamo ?? La collection de souches aurait bien eu du mal à être constituée sans les huîtres qu'ils me fournissaient. Et plus tard, Céline Garcia, Bruno Chollet, Maeva Robert, Isabelle Arzul et Jean-Pierre Joly ont toujours été là pour venir voir les trucs bizarres sur mes lames... (y a pas à dire les huîtres de Fouras sont riches en éléments "bizarroïdes") ou pour répondre à mes questions diverses et variées!!

Sans oublier le reste de l'équipe : Franck Berthe (le "papa" de la bactériologie à La Tremblade), Nathalie Cochenec, Nicole Faury (Victor toujours!), Anne Goubet, Nolwenn Kerdudou, Laurence Miossec (bon courage pour l'écologie microbienne!), Jean-François Pépin, Denis Saulnier et Anne Thébault.

Un grand merci à toute l'équipe génétique et/ou éclosion : Pierre Boudry, Sylvie Lapègue, Helen McCombie, Edouard Bédier, Raphaël Brizard, Serge Heurtebise, Christophe Ledu, Pascal Phelipot, Frédéric Blouin, Jean-Cristophe Billy, Florence Cornette. Vous avez réussi à trouver de la place pour mes petites bêtes dans les conditions requises (plus chaud, plus froid...), histoire qu'elles soient choyées avant la torture, merci pour elles!!! Sans oublier Tim Sharbel, pour sa bonne humeur et ses nombreuses corrections de mes "œuvres" en langue anglaise.

Je n'oublie pas les déploiements d'ingéniosité de la logistique : merci à Stéphane Bodin, grâce à qui j'ai appris à scier, percer et installer un système d'arrosage au goutte à goutte pour apporter de l'air et de l'eau à mes petits souffre-douleur, merci également à Stéphane Bodin, Emile Planche et Pascal Schwerdtle pour avoir réussi à résoudre les divers petits tracas techniques.

Je tiens à remercier l'ensemble du LERPC et plus particulièrement Patrick Soletchnik pour son aide précieuse dans l'analyse statistique de mes résultats, et Stéphane Robert et Daniel Razet, merci les "papys Miceys"!!

J'adresse de sincères remerciements à l'équipe administrative de choc : Martine Grasset pour ta patience face à ma tête de linotte, Florence Rivet pour mes nombreuses listes de demande d'articles ("si par hasard tu demandes des publis à Nantes, tu pourras rajouter celle-là") et bien sur Delphine Rousic pour ta disponibilité, ta gentillesse et bien plus encore (le delphinarium paraît bien vide depuis que tu as rejoint ta Bretagne natale).

Un grand merci à l'ensemble des stagiaires pour leur bonne humeur et plus particulièrement à Fabien Magne, Saravanne Poubalanne, Eric Lazaille et Guénaëlle Lancelot (souviens toi les petits matins au labo!!!) qui se sont eux aussi frottés aux *Vibrio* pathogènes...

Que serait un labo sans son "troupeau" de thésards : les "grands", Corinne Audemard, Isabelle Arzul, Magali Waechter, maintenant partis vers d'autres horizons ou pas ; les "petits", Béatrice Gagnaire (dis, j'ai une question...), Nicolas Taris (n'oublie pas au moins un Calvin et Hobbes par jour) et le benjamin Christopher Sauvage, bon courage à tous les trois pour la suite... et puis il y a aussi bien sûr Karine Bouilly, tu vois finalement, on finira en même temps ; Valérie Barbosa, mais euh arrête de m'embêter et Lionel Dégremont, attends un peu qu'on vienne te voir au VIMS, tu feras moins le fier avec tes soi-disant super poissons et tes élevages larvaires sans souci!!!

J'adresse de sincères remerciements aux piqueurs invétérés, ceux de la première heure, Fabien Magne et Christophe Ledu et les suivants : Saravanne Poubalanne, Bruno Chollet, Guénaëlle Lancelot, Eric Lazaille, Frédérique Le Roux, Nicole Faury, Denis Saulnier, Yannick Labreuche (ça, c'était de la manip), Maeva Robert, Delphine Rousic (tu vois, tu es finalement arrivée) et Franck Tiquet.

Je remercie chaleureusement l'ensemble des personnes du LBCB et surtout l'équipe "Microbio" : Anne-Marie Pons, Gilles Cottenceau (pour ses conseils avisés en matière de cocultures), Sophie Sablé, Isabelle Lanneluc, Astrid Massé, Estelle Enaud, Sylvaine Dandrieux, Natacha Morin et surtout Valérie Gautier pour son aide précieuse pour couler les douze mille boîtes de Zobell et tester les X mille colonies de mutants et Cyrille Barthélémy pour m'avoir supportée en tant que voisine de bureau et de paillasse!!!! Sans oublier super Laetitia (t'es sûre tu veux pas un petit d'Orphée??) et Sandrine Didelot (super Moumoune!!), merci pour votre bonne humeur et votre gentillesse.

Mille mercis et toute ma gratitude à Bruno Chollet et Maeva Robert qui ont accepté de m'accueillir dans leur bureau... bon d'accord vous ne m'aviez pas prévenu qu'il y avait une contrepartie, faire office de secrétaire, mais c'était quand même très agréable de partager (ou d'envahir) cet espace avec vous. Merci pour votre bonne humeur, votre gentillesse, et tous ces petits moments de détente.

Merci à Céline Garcia et Géraldine Matheron, chasseuses de fautes d'orthographe et de grammaire hors pair : Céline, merci de tes conseils nombreux et avisés pour cette rédaction et Dgé, merci d'avoir pris le temps et d'avoir accepté de souffrir sur toute cette "prose barbare". Un grand merci à Delph, reine de la mise en page, à Ghislaine et Nathalie de "Santelys SOS Assistance Word"...

Enfin, comment remercier toutes les personnes rencontrées au cours de ce séjour en Charente Maritime et devenues des amis??? Maeva, Delph, Céline et Lionel, Béa, Bruno et Patricia, Nico et Aude, Alexandra, Corinne, Steph, Valérie, Astrid et Arnaud, Sandrine, Laetitia et Sam, Monique et Jenny. Un immense merci à vous tous, pour votre patience, votre réconfort, votre gentillesse, votre écoute, et vos "remontages de moral" !!!

Merci également à mes amis (ex-)méditerranéens, Julie, bien sûr (ca y est, on va enfin se retrouver dans la même ville) et toute la troupe des Arsouilles qui s'agrandit à vue d'œil...

Mais je ne serais jamais arrivée jusque là sans le soutien et les encouragements de ma famille. Merci à vous d'avoir eu confiance en moi pendant toutes ces années.

Enfin, "last but not least", merci au correcteur en chef qui a tout bravé, même la taxonomie, "rentreur" de biblio exemplaire, "metteur en page" hors norme, dessinateur d'arbres, et tant de choses encore... merci d'avoir toujours été là (même si c'était à 500 kms)... ..., tu te reconnaîtras.

-Sommaire-

- Introduction-	7
------------------------------	----------

- Données Bibliographiques -	9
---	----------

I - L'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	9
I.1 - Biologie	10
I.1.1 - Coquille et manteau	10
I.1.2 - Branchies.....	10
I.1.3 - Système digestif.....	11
I.1.4 - Reproduction	11
I.1.5 - Muscles.....	13
I.1.6 - Système circulatoire.....	13
I.1.7 - Mécanismes de défense.....	14
I.1.7.1 - Les effecteurs du système immunitaire : les hémocytes.....	14
I.1.7.2 - Immunité cellulaire.....	15
I.1.7.3 - Immunité humorale.....	16
I.1.8 - Autres organes	17
I.2 - Ostréiculture	18
I.3 - Agents pathogènes et mortalités anormales.....	18
I.3.1 - Parasites.....	18
I.3.2 - Virus	20
I.3.3 - Champignons.....	21
I.3.4 - Bactéries	22
I.3.5 - Mortalités estivales.....	22
I.4 - Moyens de lutte en aquaculture.....	24
I.4.1 - Pratiques d'élevage.....	25
I.4.2 - Sélection génétique.....	26
I.4.3 - Antibiotiques	26
I.4.4 - Probiotiques	26
II - Le genre <i>Vibrio</i>	28
II.1 - Taxonomie.....	28

II.2 - Ecologie.....	31
II.3 - Pathogénicité.....	33
II.3.1 - Chez l'homme.....	34
II.3.2 - Chez les organismes aquatiques.....	36
II.3.2.1 - Poissons.....	36
II.3.2.2 - Crustacés.....	40
II.3.2.3 - Autres organismes.....	40
III - Les relations <i>Vibrio</i>/Mollusques.....	42
III.1 - Commensaux et/ou bénéfiques.....	42
III.2 - Pathogènes.....	43
III.2.1 - Gastéropodes.....	43
III.2.2 - Céphalopodes.....	45
III.2.3 - Bivalves.....	45
III.2.3.1 - Larves.....	45
III.2.3.2 - Juvéniles et adultes.....	49
<hr/>	
- Objectifs -	54
<hr/>	
- Matériel et méthodes -	56
<hr/>	
I - Souches bactériennes.....	56
II - Cohabitations.....	57
III - Infections expérimentales	58
III.1 - Préparation des suspensions bactériennes.....	58
III.2 - Infections expérimentales sur palourdes.....	58
III.3 - Infections expérimentales sur huîtres	59
III.3.1 - Injection dans le muscle adducteur.....	59
III.3.2 - Injection dans la cavité palléale.....	59
III.3.3 - Balnéation.....	60
IV - Biologie moléculaire.....	61
IV.1 - Extraction d'ADN.....	61
IV.2 - Amplification en chaîne par la polymérase (PCR).....	61
IV.3 - Purification des produits de PCR.....	62

IV.4 - Clonage	62
IV.5 - Séquençage.....	63
IV.6 - Analyses phylogénétiques	63
V - Microscopie.....	64
V.1 - Microscopie photonique.....	64
<i>V.1.1 - Fixation.....</i>	<i>64</i>
<i>V.1.2 - Déshydratation, imprégnation et inclusion.....</i>	<i>64</i>
<i>V.1.3 - Coupes et coloration.....</i>	<i>65</i>
V.2 - Microscopie électronique à transmission	65
<i>V.2.1 - Fixation.....</i>	<i>65</i>
<i>V.2.2 - Déshydratation, imprégnation et inclusion.....</i>	<i>66</i>
<i>V.2.3 - Coupes et contraste.....</i>	<i>66</i>
V.3 - Cytocentrifugation	67
VI - Cytométrie en flux	67
VI.1 - Prélèvement	67
VI.2 - Mise en contact hémocytes/bactéries.....	67
VI.3 - Analyse	69
<i>VI.3.1 - Aspect des cellules.....</i>	<i>69</i>
<i>VI.3.2 - Mortalité hémocytaire.....</i>	<i>69</i>
<i>VI.3.3 - Apoptose.....</i>	<i>69</i>
VII - Recherche de souches inhibitrices	70
VII.1 - Prélèvement, sélection des souches	70
VII.2 - Production des substances inhibitrices en milieu liquide.....	70
VII.3 - Etude des substances produites par la souche inhibitrice.....	71
<i>VII.3.1 - Stabilité vis-à-vis de la température et d'enzymes.....</i>	<i>71</i>
<i>VII.3.2 - Evaluation de la masse molaire.....</i>	<i>71</i>
<i>VII.3.3 - Spectre d'activité.....</i>	<i>71</i>
<i>VII.3.4 - Influence du fer.....</i>	<i>71</i>
VII.4 - Production de sidérophores	72
VII.5 - Sélection de mutants non producteurs de substances inhibitrices	72

VII.6 - Cocultures	72
VII.7 - Surnageant	73

-Résultats- 74

I - Etablissement et caractérisation de la collection de souches de <i>Vibrio</i>	74
I.1 - Constitution de la collection.....	74
I.2 - Caractérisation phénotypique.....	75
I.3 - Analyse phylogénétique basée sur la séquence partielle du gène <i>gyrB</i>	77
I.4 - Comparaison des deux méthodes.....	79
I.5 - Diversité de la flore <i>Vibrionaceae</i> des cohabitations	80
I.6 - Sélection de souches virulentes	81
II - Etude de l'infection expérimentale par les souches 31 et 32 proches de <i>V. splendidus</i> : taxonomie, altérations tissulaires et cellulaires	91
II.1 - Taxonomie.....	91
II.2 - Techniques d'infection expérimentale.....	92
II.3 - Altérations tissulaires	92
II.4 - Interactions bactéries/hémocytes	104
II.4.1 - Paramètres morphologiques des cellules.....	104
II.4.2 - Phagocytose des bactéries.....	106
II.4.3 - Taux de mortalité hémocytaire et apoptose	107
III - Influence de l'hôte sur l'action de souches de <i>Vibrio</i> pathogènes	110
III.1 - Effet génétique	110
III.2 - Effet physiologique : effort de reproduction.....	112
IV - Sélection de souches inhibitrices de souches de <i>Vibrio</i> pathogènes	116
IV.1 - Sélection et caractérisation des souches inhibitrices.....	116

IV.2 - Caractérisation biochimique et spectre d'activité de la molécule antibiotique.....	117
IV.3 - Cocultures.....	117
IV.4 - Effet du surnageant.....	118

- Discussion - 135

I - Sélection de souches virulentes.....	135
II - Etude des souches 31 et 32.....	137
III - Influence de l'hôte dans l'issue des infections expérimentales.....	140
IV - Sélection de souches inhibitrices.....	142
V - Implication de souches de <i>Vibrio</i> dans les épisodes de mortalités estivales.....	144
VI - Conclusions.....	145

-Bibliographie- 147

Liste des abréviations 174

Annexes 175

Annexe 1.....	176
Annexe 2.....	184
Annexe 3.....	192
Annexe 4.....	205
Annexe 5.....	208
Annexe 6.....	211
Annexe 7.....	213

N.B. : L'ensemble des noms latins d'espèces cités dans ce manuscrit est regroupé dans l'annexe 7 avec leur correspondance en français et en anglais.

- Introduction -

La production de l'huître creuse *Crassostrea gigas* représente depuis une dizaine d'années plus de 10 % de la production annuelle mondiale de poissons, crustacés et mollusques en terme de tonnage (soit 4,2 millions de tonnes) et 6,5 % de cette production en terme de valeur financière (soit presque 3,5 milliards de dollars) (FAO, 2003). A ce jour, l'ostréiculture française est largement dominée par *C. gigas* avec une production de plus de 120 000 tonnes, alors que la production de l'autre espèce cultivée, l'huître plate ("Belon"), *Ostrea edulis*, est inférieure à 2 000 tonnes.

L'émergence de pathologies infectieuses se développant à la faveur des conditions d'élevage intensif représente un facteur limitant le développement de l'aquaculture. L'ostréiculture française a subi plusieurs épizooties importantes. La production de l'espèce endémique, *O. edulis*, a chuté de 15 000 à moins de 2 000 tonnes suite à l'apparition de *Marteilia refringens*, protozoaire parasite de l'appareil digestif (Grizel et al., 1974) et de *Bonamia ostreae*, protozoaire parasite des hémocytes, (Pichot et al., 1980) au cours des années 70 et 80. L'huître creuse portugaise, *Crassostrea angulata*, qui avait été introduite et cultivée à partir de 1860, a, quant à elle, subi deux épisodes de mortalité massive dus à des iridovirus (Comps & Duthoit, 1976 ; Comps, 1988). Le seul recours face à la disparition de *C. angulata* a été l'importation de *C. gigas* à partir de populations américaines et japonaises (Grizel & Heral, 1991).

Depuis leur introduction, les populations de *C. gigas* subissent des épisodes dits de mortalités estivales pour lesquels une étiologie plurifactorielle est suspectée. Ces phénomènes constituent un sujet préoccupant pour la profession ostréicole. En effet, lors de la disparition de *C. angulata* au cours des années 1970, *C. gigas* a été introduite pour la remplacer, alors qu'aujourd'hui, aucune autre espèce ne serait disponible pour compenser la perte de *C. gigas*.

La majorité, voire la totalité de l'élevage de *C. gigas* s'effectue en milieu ouvert. Or, ce type d'élevage ne permet aucun contrôle de la qualité de l'environnement (propriétés physico-chimiques de l'eau, présence de polluants, quantités d'alimentation) et rend l'application de traitements chimiques impossible. Le seul moyen disponible pour limiter le développement d'épizooties reste donc la prévention, cependant, le système de défense non adaptatif des mollusques ne permet pas l'utilisation de vaccins. Le développement de mesures

prophylactiques nécessite une bonne connaissance des agents infectieux et des méthodes de diagnostic spécifiques.

Dans les études sur les maladies infectieuses, la reproduction des symptômes et mortalités en infection expérimentale constitue une étape primordiale. En effet, il est souvent difficile de déterminer les facteurs intervenant dans des phénomènes de mortalité à partir des seules observations effectuées sur le terrain. Grâce aux infections expérimentales, les différents facteurs modulant le développement et l'issue d'une maladie infectieuse peuvent être évalués. Par ailleurs, celles-ci permettent de tester des outils de diagnostic spécifiques sur de grands nombres d'individus dont le statut vis-à-vis de la maladie étudiée est connu. Ainsi, le développement du modèle d'infection de l'huître plate, *O. edulis* par le parasite *B. ostreae* a permis la mise au point d'outils de détection spécifique (techniques immunologiques puis de biologie moléculaire), la description des mécanismes de défense mis en place et l'étude de la variabilité en fonction de facteurs environnementaux ou génétiques (Besnard-Cochennec, 2001).

Malgré l'importance économique de *C. gigas*, peu de données sont disponibles concernant son système immunitaire et l'influence de facteurs et/ou agressions biotiques ou abiotiques sur celui-ci. Ainsi, le but de ce travail est de développer et d'étudier une infection expérimentale chez *C. gigas* par des souches de *Vibrio*. Ce genre bactérien a été choisi car il est le plus fréquemment associé à des épisodes de mortalité d'animaux aquatiques, de plus, son implication est suspectée dans les épisodes de mortalités estivales chez *C. gigas*.

- Données Bibliographiques -

I - L'huître creuse *Crassostrea gigas*

L'huître creuse *Crassostrea gigas* est originaire d'Asie. Elle a été introduite sur les côtes des continents américain, océanien et européen au cours du XX^{ème} siècle. A ce jour, elle est cultivée dans 27 pays et sa production est évaluée à plus de 4,2 millions de tonnes en 2003, ce qui représente une grande majorité de la production conchylicole mondiale.

Cette espèce appartient à l'embranchement des Mollusques, classe des Lamellibranches (*Bivalvia*), ordre des *Filibranchia*, sous-ordre des *Anisomyaria*, super-famille des *Ostreoidea*, famille des *Ostreidae*, genre *Crassostrea* et espèce *gigas*. Ce sont des animaux métazoaires (organisme pluricellulaire), triploblastiques (possédant entre l'ectoderme et l'endoderme un troisième feuillet individualisé, le mésoderme), cœlomates (possédant un coelome), protostomiens (dont la bouche embryonnaire donne la bouche adulte), hyponeuriens (système nerveux ventral) à symétrie bilatérale. Leur corps est mou, non segmenté.

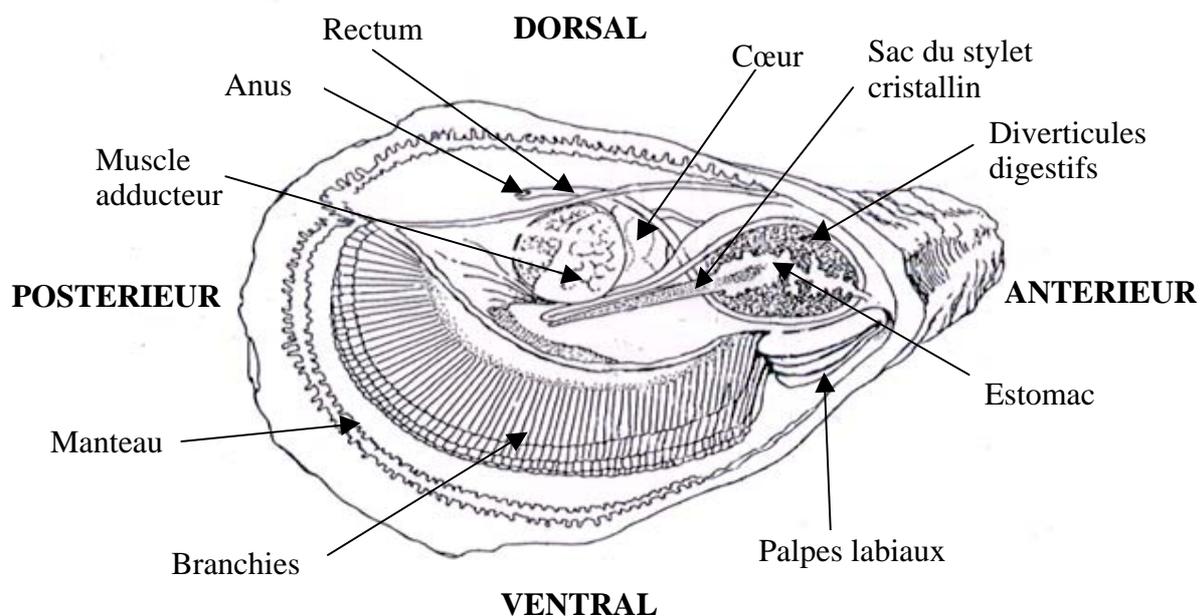


Figure 1. Anatomie de l'huître creuse *Crassostrea gigas* d'après Howard & Smith (1983).

I.1 – Biologie

Les données de ce chapitre sont tirées des ouvrages de Galstoff (1964) et de Grizel (2003). Les principaux organes de l'huître sont représentés sur la Figure 1.

1.1.1 - Coquille et manteau

La coquille est sécrétée par la face extérieure et le bord libre du manteau. Elle est constituée de conchyoline et de calcite. Sa croissance est irrégulière, tributaire de facteurs externes (température, apports trophiques) et internes (reproduction), et présente donc des stries de croissance. Chez l'huître, la coquille est asymétrique, avec une valve supérieure plate et une inférieure creuse. Les valves sont reliées au niveau de la partie antérieure par la charnière et par le ligament qui prolonge la charnière. La fonction de celui-ci est purement mécanique : il permet la séparation des deux valves quand le muscle adducteur se relâche et une fermeture parfaite des deux valves quand le muscle est contracté.

Le manteau, qui enveloppe tous les organes, est composé de 2 lobes palléaux qui se rejoignent dans la partie dorsale. Il est constitué de tissus mous (tissu conjonctif, faisceaux musculaires et nerveux, organes sensoriels, système vasculaire, cellules pigmentaires et sécrétrices).

Outre la sécrétion de la coquille, ses fonctions sont diverses :

- le courant d'eau créé par ses cils participe à la nutrition, la respiration et la dissémination des gamètes ;
- les nombreuses terminaisons nerveuses interviennent dans la réception et la transmission de stimuli extérieurs ;
- le tissu conjonctif sert de lieu de stockage des substances de réserve (lipides, glycogène) ;
- la sécrétion de mucus constitue un mécanisme de défense.

1.1.2 - Branchies

L'huître possède une paire de branchies, chacune constituée de deux lames. En coupe transversale, les branchies forment un W, chaque lame étant constituée de 2 feuillets. Ceux-ci sont constitués de filaments insérés de façon parallèle entre eux. On observe également des vaisseaux afférents et efférents, des muscles et des faisceaux nerveux. Les branchies sont le site de l'absorption de l'oxygène. L'huître ne possédant pas d'hémocyanine ou d'hémoglobine,

l'oxygène est transporté, des branchies vers les organes, dissous dans l'hémolymphe. Les branchies participent également à l'alimentation en dirigeant les particules alimentaires vers les palpes labiaux par un courant d'eau et en absorbant directement des particules nutritives et des matières organiques dissoutes. Elles participent également à l'excrétion de certains déchets.

1.1.3 - Système digestif

Les huîtres sont des filtreurs, microphages, se nourrissant de petites particules (bactéries, phytoplancton, ...). Les particules alimentaires sont d'abord triées par le manteau et les branchies puis dirigées vers les palpes labiaux par le courant d'eau créé par les branchies. Les palpes labiaux, au nombre de quatre sont constitués de lèvres de forme triangulaire. Grâce à leurs cils et à de nombreuses cellules mucocytaires, ils participent au tri et guidage des éléments nutritionnels vers le tractus digestif. Les particules pénètrent dans celui-ci par la bouche, située entre les palpes labiaux, suivie d'un court œsophage. Elles atteignent ensuite l'estomac dans lequel débouchent les diverticules digestifs et le stylet cristallin, animé de mouvements de rotation et libérant des enzymes digestives. L'estomac se prolonge par l'intestin et le rectum qui longe le muscle adducteur et débouche sur l'anus.

1.1.4 - Reproduction (Figure 2)

Le mode de reproduction est primitif avec fécondation externe et hermaphrodisme successif protandrique. La phase de repos sexuel se situe pendant l'hiver, période de changement de sexe. Au printemps, à la faveur de conditions environnementales favorables, la gamétogénèse reprend à partir des cellules germinales, pour arriver à maturité sexuelle au cours de l'été. Un individu peut émettre plusieurs dizaines de millions de gamètes, compensant la forte mortalité larvaire. La gonade se développe autour de la glande digestive et est enveloppée d'un tissu conjonctif. Les gamètes sont émis dans l'eau et 24 h après la fécondation, la larve véligère, dite larve D, possède une coquille et un vélum, organe servant à sa nutrition et locomotion. Au stade pédivéligère (après une vingtaine de jours de vie pélagique), la larve développe un pied participant à la recherche d'un substrat pour sa fixation. Une fois fixée, la larve débute sa métamorphose qui entraîne de nombreux remaniements : disparition du pied et du vélum, apparition du manteau et des branchies. L'huître atteint alors le stade naissain (ou juvénile). Elle passera le reste de sa vie fixée au substrat sans autre modification qu'une augmentation

de taille. Le stade adulte est considéré comme atteint après la première saison de reproduction.

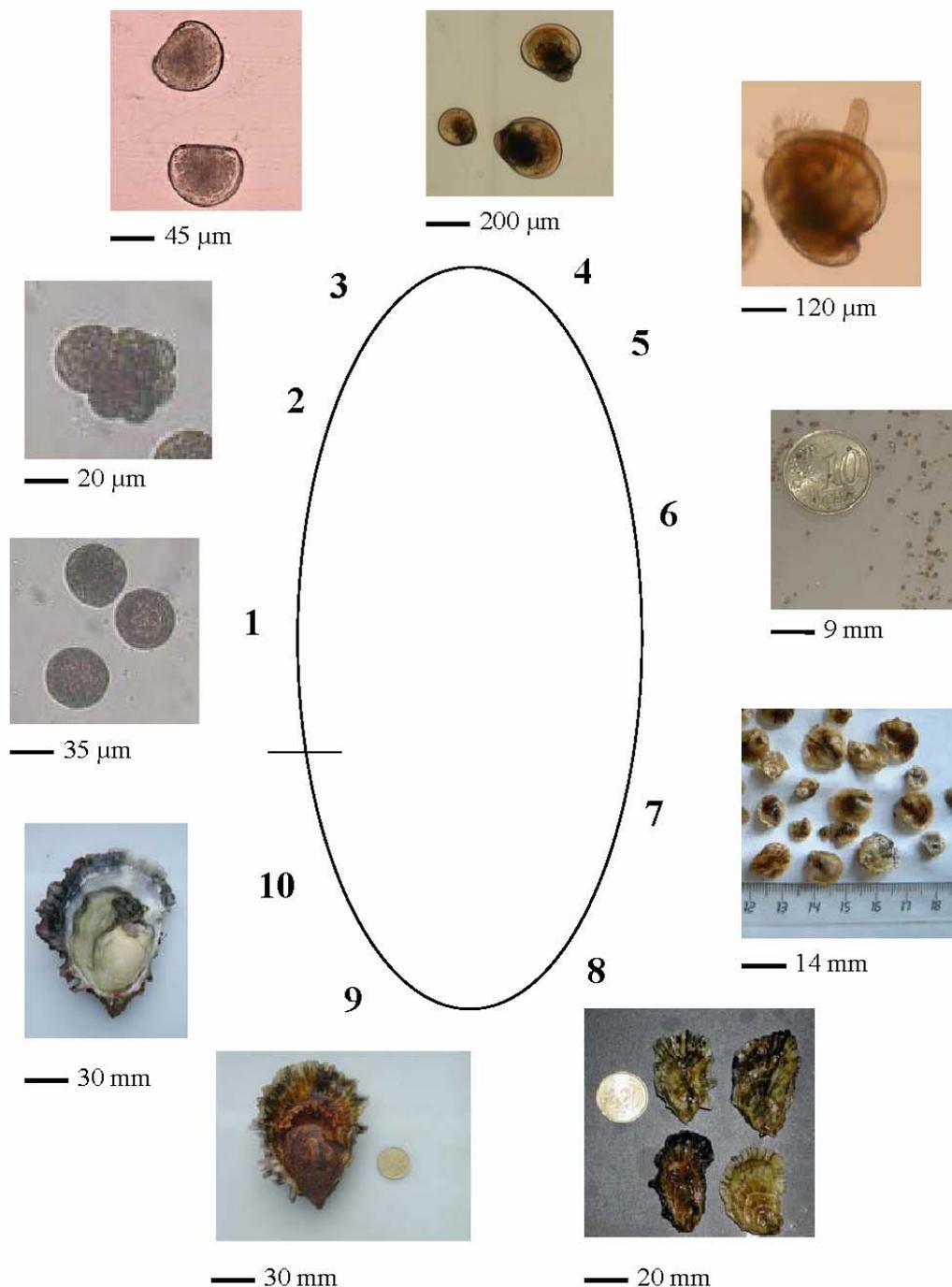


Figure 2. Cycle biologique de l'huître creuse *C. gigas*, d'après Dégremont (2003).

1- Fécondation : ovocytes en présence de spermatozoïdes (points noirs ou réfringents). 2- Embryon stade morula (2-3 heures). 3- Larves D (24 heures). 4- Larves véligères (14 jours). 5- Larve pédivéligère (18 jours). 6- Naissains post-fixation (1 mois). 7- Naissains (2 mois). 8- Naissains (6 mois). 9- Adulte (10 mois). 10- Géniteur mature (10 mois). *Nb : l'âge indiqué pour les photos 7 à 10 est représentatif d'huîtres élevées en nurserie et en claire ostréicole, mais pas pour des huîtres du milieu naturel.*

1.1.5 - Muscles

L'huître possède un organe musculaire, le muscle adducteur, servant à l'ouverture et fermeture de la coquille. Il s'agit d'un organe massif, situé dans la partie postéro-dorsale du corps. Il est fermement attaché à chaque valve par une couche de cellules spécialisées. L'ensemble de l'organe est soutenu par une enveloppe de tissu conjonctif. Il est composé de deux parties, une translucide, de forme ovale, occupant les deux-tiers de l'organe et une blanche, en forme de croissant. La partie translucide semble être responsable des mouvements de fermeture rapide de la coquille, alors que la partie blanche semble faire office de contrepoids à la force du ligament et donc empêche une trop grande ouverture des valves. Chaque partie présente une structure homogène, avec les fibres musculaires regroupées en faisceaux denses entourés de tissu conjonctif. Les fibres musculaires sont de longues cellules cylindriques contenant un cytoplasme homogène constitué de fibrilles, un noyau ovale et des mitochondries situés à la périphérie de la cellule. Des hémocytes sont généralement observés entre les fibres.

L'huître possède également de nombreux faisceaux musculaires dans le manteau pour sa rétraction, dans les branchies pour assurer les courants d'eau et la circulation de l'hémolymphe, dans le cœur et autour des artères pour assurer la distribution de l'hémolymphe et autour de l'estomac et dans les palpes labiaux probablement pour participer à la digestion.

1.1.6 - Système circulatoire

L'appareil circulatoire est de type lacunaire ou semi-ouvert, il est donc constamment en contact avec le milieu extérieur. Le cœur est situé contre le muscle adducteur dans la cavité péricardique. Il est composé d'un ventricule et de 2 oreillettes. Le ventricule expulse l'hémolymphe dans les aortes antérieures et postérieures. L'hémolymphe circule ensuite dans les artères et les artérioles, puis dans des sinus de taille variable qui mettent les organes au contact direct de l'hémolymphe. Celle-ci est ensuite épurée dans le rein, puis circule vers les branchies par les vaisseaux afférents et en repart, après hématose, par les vaisseaux efférents jusqu'aux oreillettes (Figure 3).

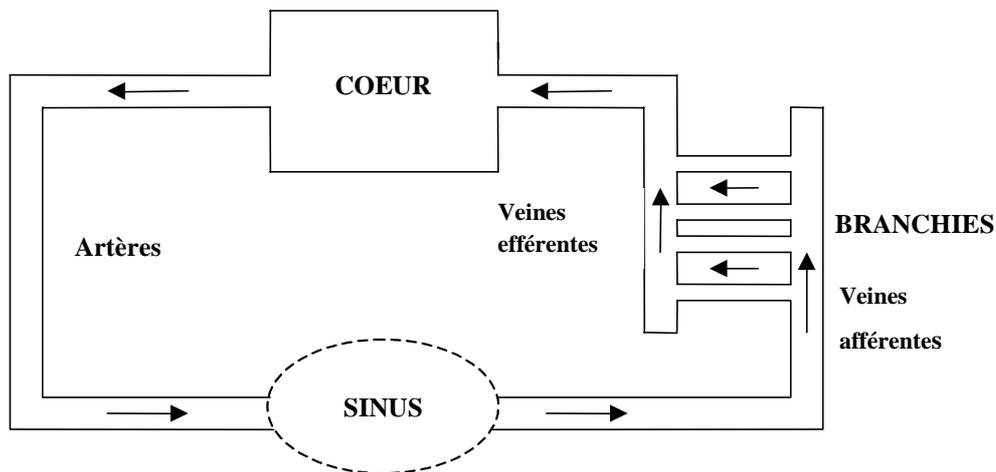


Figure 3. Diagramme schématisant le système circulatoire chez les mollusques bivalves, d'après Gagnaire (2002), modifié d'après Cheng (1981).

1.1.7 - Mécanismes de défense

La coquille et le manteau constituent une protection mécanique contre les agressions extérieures. En cas de danger détecté par les tentacules disposées le long du manteau, la coquille se ferme. Quand la coquille est ouverte, le manteau fait office de filtre, rejetant les particules trop grosses.

Le système immunitaire des huîtres est non adaptatif puisqu'il est dépourvu des acteurs de la mémoire immunitaire (cellules lymphoïdes et anticorps). Il possède néanmoins des mécanismes de reconnaissance soi/non-soi ainsi que les deux grands types de réponses immunitaires, cellulaire et humorale.

1.1.7.1 - Les effecteurs du système immunitaire : les hémocytes

Les hémocytes sont présents dans le réseau sanguin (cœur, artères, sinus veineux, veines) et dans les lacunes sanguines des organes mais sont également infiltrés dans les tissus. Cependant le lieu et le processus de l'hématopoïèse sont encore inconnus (Barreau-Roumiguière et al., 2003). Malgré quelques légères différences, les auteurs s'accordent à décrire deux grands types d'hémocytes chez les bivalves (Hine, 1999), les granulocytes et les agranulocytes ou hyalinocytes. Les grandes fonctions des hémocytes sont (Cheng, 1981 ; Feng, 1988 ; Fisher, 1988 ; Hine, 1999) :

- l'agrégation : formation d'amas cellulaires (clou hémostatique) réversibles suite à des stimulations ;

- l'adhésion et le déplacement sur un substrat inerte ou non : phénomènes qui participent avec l'agrégation à la réparation de lésions tissulaires ou de la coquille ;
- la plasticité : par le déploiement de pseudopodes, les hémocytes passent d'une forme sphérique à une forme amoeboïde facilitant l'infiltration et le déplacement ;
- le chimiotactisme : les hémocytes sont attirés par des substances produites par les organismes étrangers ou par l'huître en cas de blessure ou de réaction inflammatoire ;
- la réparation de blessures : par infiltration du site lésé et colmatage de la lésion, différenciation cellulaire (production de fibres de collagène liant les hémocytes agrégés entre eux), phagocytose des débris cellulaires et réparation des épithéliums ;
- la réparation de la coquille par mobilisation et transport de calcium et de protéines vers la lésion, puis dépôt de ces éléments sur le site de la lésion ;
- la sécrétion/excrétion : production de la majorité des enzymes hydrolytiques, molécules cytotoxiques, substances intervenant dans les activités hémocytaires, substances associées à l'homéostasie, substances de modulation de la réponse immunitaire, du stress ou de l'inflammation ;
- les mécanismes de défense ;
- la digestion et le transport des nutriments.

I.1.7.2 - Immunité cellulaire

Elle comprend les mécanismes de défense impliquant les hémocytes eux-mêmes. Les trois phénomènes principaux sont l'infiltration, la phagocytose et l'encapsulation.

L'infiltration conduit à une forte concentration d'hémocytes sur le site de la lésion ou de l'infection. L'issue peut être soit la destruction ou l'isolement de l'organisme étranger, soit la réparation complète du tissu, soit, dans quelques cas extrêmes, la destruction du tissu de l'hôte. Les principales étapes sont : infiltration du lieu lésé ou infecté par de nombreux hémocytes, formation d'un amas par des hémocytes agrégés, remplacement des tissus endommagés par des hémocytes allongés, dépôt de collagène, élimination des tissus nécrotiques par des hémocytes phagocytaires et restauration de l'architecture normale du tissu (Feng, 1988). A ce jour, l'origine des hémocytes infiltrants n'est pas encore clairement établie, il s'agit soit du recrutement de cellules présentes dans d'autres compartiments, soit d'une

multiplication *in situ*. Les hémocytes infiltrants agissent dans la lutte contre l'agent infectieux et/ou dans la réparation des tissus lésés (Ford et al., 1993).

La phagocytose est le mécanisme le plus important et le mieux décrit car il est facilement reproductible *in vitro* (Xue et al., 2001 ; Lambert et al., 2003 ; Goedken & De Guise, 2004). Les différents événements sont similaires à ceux décrits chez les mammifères. La première étape est la reconnaissance de l'organisme comme étranger par l'intermédiaire de récepteurs et de lectines (Olafsen et al., 1992). Après adhésion de la particule étrangère sur l'hémocyte, la membrane cytoplasmique de celui-ci englobe la particule étrangère par contraction du cytosquelette. L'internalisation de la particule dans le cytoplasme de l'hémocyte se fait sous forme d'un phagosome qui fusionne avec un ou plusieurs lysosomes pour former le phagolysosome, la particule est détruite par les enzymes lysosomiales ou par la flambée oxydative. Cette dernière consiste en la production de radicaux libres, formes intermédiaires réactives de l'oxygène, et de peroxyde d'hydrogène. Les produits de dégradation de la particule sont soit utilisés par la cellule (accumulés dans des vacuoles sous forme de pigment tel la mélanine), soit libérés dans le milieu extracellulaire par l'intermédiaire de vésicules (Feng, 1988 ; Xue, 1998).

Différents types cellulaires sont capables de phagocytose. Parmi les hémocytes, les granulocytes présentent la plus forte activité phagocytaire (Hine, 1999 ; Goedken & De Guise, 2004). Les cellules céreuses ou cellules brunes participent également au phénomène de phagocytose sur les sites de lésions et d'infections (Hine, 1999).

L'encapsulation concerne les agents pathogènes métazoaires (trématodes, cestodes) de grande taille ne pouvant pas être phagocytés. L'agent infectieux est entouré d'une couche interne constituée de cellules comparables à des fibroblastes et d'une couche externe constituée de matériel fibreux contenant des glycoprotéines et/ou des mucoprotéines et infiltrée par des hémocytes. La destruction du pathogène serait due à la β -glucuronidase (Feng, 1988).

I.1.7.3 - Immunité humorale

Il s'agit de l'ensemble des substances luttant contre des agents pathogènes, des toxines ou des polluants (Chu, 1988 ; Xue, 1998 ; Roch, 1999) :

- les enzymes hydrolytiques responsables de la lyse intra ou extracellulaire (lysozyme, β -glucuronidase, phosphatases acide et alcaline, sérine protéase, amylase, lipases) ;

- les lectines, protéines pouvant se fixer spécifiquement à des sucres, fonctionnent comme des opsonines en reconnaissant des ligands étrangers et peuvent être induites par la présence de pathogènes (Olafsen et al., 1992) ;
- le système prophénoloxydase-phénoloxydase : la phénoloxydase activée catalyse la réaction de conversion de substances phénoliques en mélanine ; les composés intermédiaires de cette réaction sont bactéricides et interviennent dans les phénomènes de reconnaissance du non-soi (Luña-Gonzalez et al., 2003) ;
- les protéines de stress (heat shock proteins) permettent d'accroître la capacité des cellules à supporter les variations de l'environnement (Boutet et al., 2003) ;
- la NO synthase catalyse la production d'oxyde nitreux qui intervient en tant qu'agent anti-bactérien et anti-tumoral (Arumugan et al., 2000) ;
- les peroxydases interviennent dans les mécanismes de la flambée oxydative ;
- des molécules cytotoxiques et certaines substances physiologiques telles la transferrine et la lactoferrine inhibent les agents pathogènes (Roch et al., 1996 ; Montagnani et al., 2001 ; Romestand et al., 2002 ; Gueguen et al., 2003).

A ce jour, aucun peptide anti-microbien n'a été caractérisé chez *C. gigas* alors que ce type de molécule est décrit dans tout le règne vivant, y compris chez certains mollusques (Mitta et al., 1999 ; Gueguen et al., 2003) et que des activités antibactériennes et antivirales ont été observées dans l'hémolymphe d'huîtres (Hubert et al., 1996 ; Olicard, 2003).

Des mécanismes de détoxification mettant en jeu la métallothionine et les glycoprotéines-P transmembranaires ont été mis en évidence chez l'huître pour l'élimination de polluants ou de toxines (Anderson et al., 1999 ; Bard, 2000 ; Boutet et al., 2004).

1.1.8 - Autres organes

Le système excréteur est composé de 2 parties, la glande péricardique, située au niveau du péricarde et le rein proprement dit, situé de chaque côté de la masse viscérale près du cœur. Ces 2 structures sont reliées entre elles par le canal réno-péricardique. La glande péricardiale intervient dans la filtration et l'épuration de l'hémolymphe et dans la formation de l'urine. Le rein est composé de métanéphridies, tubules très pelotonnés et associés à une intense vascularisation. Il intervient dans la régulation osmotique et dans la formation et l'élimination des déchets ammoniacés.

Le système nerveux est primitif, constitué de ganglions cérébroïdes et viscéraux reliés entre eux par des faisceaux connectifs. Le ganglion viscéral est situé contre la partie

postéroventrale du muscle adducteur. Les ganglions cérébroïdes sont situés sous les palpes labiaux. De nombreux nerfs partent des ganglions pour innerver les organes.

I.2 - Ostréiculture

La totalité ou la majorité du cycle d'élevage de l'huître creuse se déroule en milieu ouvert, les juvéniles d'huîtres provenant pour 90 % du captage naturel des larves sur le terrain et pour 10 % de la production de larves en écloserie (Robert & Gerard, 1999). Le captage consiste à disposer, au cours de l'été, des structures appelées collecteurs et destinées à servir de support de fixation pour les larves d'huîtres avant leur métamorphose. Six à dix-huit mois après la fixation, les huîtres sont détachées ("détroquées") de ces supports. Le reste de l'élevage s'effectue soit en poches grillagées posées sur des tables métalliques, soit "semées" sur des terrains pour l'élevage à plat, soit collées à des cordes pour l'élevage en suspension (Méditerranée). Dans certains cas, une fois l'âge adulte atteint, les huîtres sont affinées en claires avant commercialisation, la durée d'élevage et les densités dans ces claires correspondant à différentes appellations (Fines de claires, Spéciales de claires et Pousse en claire).

I.3 - Agents pathogènes et mortalités anormales

De nombreux épisodes de mortalité anormale ont été observés chez *C. gigas* et une grande variété d'agents pathogènes y a été associée (Imai et al., 1965 ; Glude, 1975 ; Gouletquer et al., 1998). Par ailleurs, de nombreuses notes font état de la présence de divers organismes sans toujours statuer sur leurs interactions avec *C. gigas*. Les agents pathogènes et/ou opportunistes décrits chez les mollusques d'intérêt économique sont regroupés dans le "Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish" (Bower et al., 1994 ; Bower & McGladdery, 2003).

1.3.1 - Parasites

Mikrocytos mackini est un parasite uninucléé présent dans le tissu conjonctif (Farley et al., 1988). La maladie due à ce parasite se développe au printemps et se traduit par la présence de pustules vertes sur le manteau et les palpes labiaux. En histologie, au niveau des pustules, les

parasites sont observés dans le cytoplasme de cellules du tissu conjonctif, d'hémocytes ou de cellules musculaires et associés à une intense infiltration hémocytaire et à une nécrose des tissus (Farley et al., 1988 ; Hine et al., 2001). A ce jour, ce parasite est confiné à la Colombie Britannique (Canada) où il induit des mortalités de l'ordre de 15-35 %. Il représente un danger potentiel dû à son large spectre d'hôtes.

Haplosporidium nelsoni est un parasite de l'huître creuse américaine, *Crassostrea virginica*, chez qui il induit de fortes mortalités suite à la destruction progressive de l'épithélium des diverticules digestifs (Ford & Haskin, 1982). Ce parasite est observé chez *C. gigas* (Friedman et al., 1991 ; Renault et al., 2000c) mais généralement avec des prévalences faibles et sans induire de mortalités (Katkansky & Warner, 1970). Renault et al. (2000c) ont montré par hybridation *in situ* que le parasite observé chez *C. gigas* en Europe est bien le même que celui observé chez *C. virginica*.

Marteilioides chungmuensis est un parasite intracytoplasmique des ovocytes de *C. gigas*, actuellement limité à la Corée et au Japon avec des prévalences de l'ordre de 40-70 % (Becker & Pauley, 1968 ; Comps et al., 1986). Dans les cas fortement infestés, les ovocytes sont parfois nécrotiques et une infiltration hémocytaire y est associée. Aucune mortalité n'est associée à ce parasite, mais la présence de nodules rend la commercialisation de ces animaux difficile et a un impact sur la reproduction et les populations (Ngo et al., 2003). On peut également noter la description d'un protozoaire affectant les ovocytes de *C. gigas* sans induire de mortalités (Matsusato & Masumura, 1981).

Mytilicola orientalis est un copépode parasite de l'intestin de *C. gigas* (Bower & McGladdery, 2003). Il se fixe dans la paroi intestinale et peut induire une modification de la structure et/ou de la forme des cellules intestinales. Bien que ne provoquant pas de mortalité, il semble que de forts taux d'infestation (plus de 5 parasites par huître) affaiblissent les huîtres et diminuent leurs réserves en glycogène (Chew et al., 1965 ; Steel & Mulcahy, 2001).

La coquille de l'huître peut être endommagée par des animaux (vers polychètes du genre *Polydora* ou éponges du genre *Cliona*) se développant dans des substrats calcaires (roches, coquilles). Ces altérations n'affectent généralement pas la santé de l'huître mais peuvent diminuer l'indice de condition des animaux. En revanche, ces infestations rendent les animaux difficilement commercialisables (Handley & Bergquist, 1997 ; Caceres-Martinez et al., 1998 ; Bower & McGladdery, 2003).

Les ciliés sont souvent associés à des huîtres moribondes, mais dans la plupart des cas, ils se nourrissent des bactéries présentes et des tissus morts et n'ont donc pas d'implication pathogène (Bower & Meyer, 1993). Cependant, lors d'un épisode de mortalité (50%) dans une

nurserie de *Crassostrea sikamea* et *C. gigas*, les seuls organismes potentiellement pathogènes observés étaient des ciliés orchitophryides dont le nombre était corrélé avec la morbidité (Elston et al., 1999a). L'infestation semble débiter dans la cavité palléale, puis se propager dans l'espace extrapalléal, la cavité viscérale puis la cavité coelomique.

Enfin, Bower et McGladdery (2003) font état de nombreux autres parasites, d'importance variable et qui ne font souvent l'objet que de notes descriptives : des trématodes (*Bucephalus* sp. ou *Gymnophalloides* sp.) au stade métacercaire dont l'impact est variable allant de la castration à la mort ; des copépodes, parasites des branchies généralement inoffensifs mais pouvant engendrer des lésions en cas de forts taux d'infestation ; des crabes (*Pinnotheres pholadis*) vivant dans la cavité du manteau sans causer de dommage à l'hôte, mais diminuant sa valeur commerciale ; des grégarines (*Nematopsis* sp.) dont différents stades sont présents principalement dans les branchies, sans conséquence pour la santé de l'huître ; des turbellariés vivant dans la cavité palléale de l'huître ou dans le sédiment, non pathogène de l'huître à moins d'un fort taux d'infestation ; des nématodes présents dans les gonades.

1.3.2 - Virus

Les infections virales sont responsables de fortes mortalités chez les huîtres creuses. Des iridovirus sont à l'origine de la disparition de *Crassostrea angulata* du littoral français (Comps & Duthoit, 1976 ; Comps, 1988). Une première épizootie, appelée maladie des branchies, a touché les populations de *C. angulata* en 1967. Les premiers signes sont des taches jaunes sur les branchies. Celles-ci ainsi que les palpes labiaux présentent de nombreuses lésions nécrotiques en bordure desquelles sont observées des cellules géantes contenant des virioplasmés. La deuxième épizootie, appelée maladie hémocytaire, est apparue en 1970 et a éradiqué les populations de *C. angulata*. Aucun signe macroscopique spécifique n'est associé à cette infection, mis à part une faiblesse du muscle adducteur. La lésion histologique caractéristique est une intense infiltration hémocytaire dans le tissu conjonctif, associée à la présence d'hémocytes atypiques contenant des virioplasmés. L'hôte ayant disparu, les recherches sur ces maladies ont été arrêtées et le ou les agents responsables de ces épizooties n'ont pas été isolés. *C. gigas* semble être résistante à ces pathogènes puisque aucune mortalité n'a été observée sur les populations présentes géographiquement proches de celles de *C. angulata* subissant ces épizooties (Comps, 1972).

Une maladie due à un iridovirus (maladie du vélum) a également été décrite sur des larves de *C. gigas* en éclosion (Elston, 1979 ; Elston & Wilkinson, 1985). Le phénomène se reproduit

tous les ans à partir du printemps avec des pertes allant jusqu'à 50%. La maladie se caractérise par une activité réduite et une nage anormale des larves qui ont tendance à sédimenter. Les lésions et les virioplasmes sont observés dans les épithéliums du vélum, de la bouche, de l'œsophage et parfois du manteau.

La première description d'un herpesvirus chez un bivalve marin date de 1972 (Farley et al., 1972). Ce virus a été observé suite à une analyse en microscopie électronique à transmission d'huîtres maintenues expérimentalement à 28-30 °C et ayant subi plus de 50 % de mortalité, alors que les lots maintenus à 12-18 °C présentaient un taux de mortalité de 18 %. En 1992, des mortalités importantes associées à la présence d'un virus de type herpes ont été observées chez des larves d'huître creuse *C. gigas* en éclosion en Nouvelle Zélande et en France (Hine et al., 1992 ; Nicolas et al., 1992b).

Au cours des étés 1993, 1994 et 1995, de fortes mortalités (80-90 %) de naissain de *C. gigas* sur le terrain ont également été associées à la détection d'un virus de type herpes nommé OsHV1 (Renault et al., 1995 ; Renault et al., 2000a). Sa pathogénicité n'a été démontrée par infection expérimentale que pour les stades larvaires (Le Deuff, 1995). Sa présence a été observée sur plusieurs espèces de mollusques (Arzul, 2001). Les principaux tissus lésés sont le tissu conjonctif du manteau et du vélum pour les larves et celui du manteau et des branchies pour le naissain. La chromatine des cellules altérées est condensée et/ou présente des motifs anormaux. Les infiltrations hémocytaires associées aux lésions sont réduites (Renault et al., 1994a ; Renault et al., 1994b). Des particules virales sont observées dans le noyau et le cytoplasme des cellules infectées.

L'infection par un virus de type papovavirus induit une hypertrophie massive des gamètes et de l'épithélium gamétogonique. Ce virus se réplique dans le noyau de l'hôte et il est généralement présent en faibles quantités. Il n'induit que peu ou pas de réponses de la part de l'hôte (Farley, 1978 ; Choi et al., 2004).

1.3.3 - Champignons

Le champignon *Ostracoblabe implexa* se développe dans la coquille de plusieurs espèces d'huîtres (*Ostrea edulis*, *Saccostrea cucullata*, *C. gigas*, *C. angulata*) (Bower & McGladdery, 2003). La maladie est limitée à la coquille mais le champignon peut la traverser et atteindre la face interne de la coquille ce qui entraîne une production excessive de conchyoline. Si l'infection touche la zone d'attachement du muscle, la fermeture des valves est compromise. Les altérations de la coquille peuvent rendre les huîtres invendables.

1.3.4 - Bactéries

Le genre *Vibrio* est le plus impliqué dans les mortalités de mollusques, il fait l'objet d'une partie indépendante (cf. III).

L'agent étiologique de la maladie du ligament de la charnière chez les juvéniles de *C. gigas* est une bactérie du genre *Cytophaga*. Elle induit des mortalités massives (70-90 % en 1 semaine) et est présente en fortes densités dans les tissus de l'huître (Dungan & Elston, 1988 ; Dungan et al., 1989). L'espace palléal et les tissus du manteau sont généralement envahis par les bactéries qui provoquent des nécroses tissulaires. La présence de bactéries dans l'espace palléal induit l'infiltration de nombreux hémocytes les phagocytant. La prolifération bactérienne est accompagnée d'une perte de structure et d'intégrité mécanique du ligament de la charnière avec une complète liquéfaction de l'ensemble.

Des bactéries apparentées aux genres *Chlamydia* et *Rickettsia* ont été observées chez *C. gigas*. Elles apparaissent sous forme de microcolonies dans les cellules épithéliales des branchies, du tractus digestif et du manteau. Les infections sont généralement de faible intensité et n'induisent pas de mortalité (Renault & Cochenec, 1994), même si des lésions et des infiltrations sont parfois observées (Renault & Cochenec, 1995).

Elston et al. (1999b) ont décrit, suite à l'apparition de mortalités (jusqu'à 74 %) en structure d'élevage intensif, des abcès extrapalléaux associés à une infection bactérienne chronique chez des juvéniles de *C. gigas* (1-8 mm). Ces abcès se situent entre la face interne de la coquille et le manteau dans la cavité extrapalléale. Ils sont composés de cellules moribondes, d'hémocytes et de petits bacilles droits. Le dépôt de la matrice coquillière peut être altéré et la coquille peut présenter des malformations. Cette maladie devient mortelle quand le manteau est lésé et qu'une bactériémie se développe. Les bactéries présentes dans les abcès n'ont pas été identifiées, et aucun autre pathogène n'a été observé.

Une bactérie du genre *Nocardia* a été associée à plusieurs épisodes de mortalités estivales et est décrite ci-dessous.

1.3.5 - Mortalités estivales

Depuis 1940, des épisodes de mortalité anormale de *C. gigas* en période estivale sont observés au Japon (Imai et al., 1965), aux Etats-Unis (Glude, 1975 ; Cheney et al., 2000) et en Europe (Goulletquer et al., 1998). En France, de tels épisodes sont apparus dès l'introduction de cette espèce au début des années 1970 (Maurer & Comps, 1986). Ces épisodes, dits de

mortalités estivales, présentent des taux de mortalité très variable aux niveaux temporel et spatial. En effet, les variations inter-annuelles peuvent être très fortes et des lots très proches les uns des autres peuvent subir des taux de mortalité allant de quelques % à plus de 60 %.

Les causes exactes de ces phénomènes ne sont généralement pas déterminées et une étiologie plurifactorielle est souvent suspectée. Les mortalités estivales sont la résultante d'un ensemble d'événements impliquant des facteurs de l'environnement, de l'huître et l'intervention d'agents pathogènes, sachant qu'il est possible que différents ensembles d'événements soient regroupés sous le terme "mortalités estivales". A ce jour, certains facteurs sont décrits dans la littérature comme intervenant au moins dans certains épisodes de mortalités estivales.

- 1- Le facteur environnemental le plus fréquemment cité est une température supérieure à 19-20 °C. Des températures élevées induisent un stress pour les huîtres et peuvent également avoir pour conséquences des blooms phytoplanctoniques, des proliférations de pathogènes, une hypoxie du milieu, une augmentation de la salinité ainsi que des modifications physiologiques (Imai et al., 1965 ; Glude, 1975 ; Gouletquer et al., 1998 ; Cheney et al., 2000).
- 2- L'état physiologique des huîtres est fortement lié aux conditions environnementales. Au printemps, l'augmentation de la température et de la quantité d'alimentation disponible entraînent une forte augmentation de croissance et le développement de la gamétogénèse. La majorité des ressources énergétiques acquises étant alors destinée à la reproduction, l'huître présente un bilan énergétique déficitaire en phase de maturation avancée (Soletchnik et al., 1997).
- 3- Un déterminisme génétique semble également intervenir dans ces mortalités. Aux Etats-Unis, des familles issues de parents sélectionnés pour leur résistance accrue aux phénomènes de mortalités estivales présentent une amélioration des taux de survie (Beattie et al., 1980).
- 4- Les pratiques culturales peuvent également influencer les taux de mortalité. Dans le bassin de Marennes Oléron, les huîtres élevées à plat sur le sédiment présentent des taux de mortalité supérieurs à celles élevées en poches sur des tables ostréicoles (Gouletquer et al., 1998 ; Soletchnik et al., 1999).
- 5- L'intervention d'agents pathogènes a été suspectée lors de plusieurs épisodes, cependant, à ce jour, un seul et même agent infectieux n'est pas identifié comme seule cause de ces mortalités. Un parasite du genre *Hexamita*, protozoaire flagellé, a été associé à un épisode de mortalités estivales en Alaska (taux de mortalité > 50 %) (Meyers et al., 1990). Au vu des conditions climatiques et physiologiques,

les auteurs ont conclu à une infection secondaire et au caractère opportuniste de ces protozoaires. Au cours des épisodes de mortalités estivales des années 1960 au Japon, une bactérie Gram positive a été observée (Imai et al., 1965), mais les auteurs ont suggéré une action uniquement opportuniste. En 1987, aux Etats-Unis, Elston et al. (1987) ont décrit une "bactériémie inflammatoire fatale" associée à la présence de nodules et de zones décolorées sur le manteau, les branchies et le muscle adducteur et ont rapproché ces symptômes de ceux décrits par Imai et al. en 1965. Friedman et Hedrick (1991) ont observé des symptômes identiques et les ont associés à la présence d'une bactérie actinomycète, *Nocardia crassostrea* (Friedman et al., 1998). Ces auteurs ont conclu qu'au moins une partie des épisodes de mortalités estivales aux Etats-Unis était due à cet agent pathogène. En France, lors des épisodes de mortalités estivales des années 1990, deux types de pathogènes ont été identifiés : 1) un virus de type herpès a été observé sur de nombreux lots subissant des mortalités (Renault et al., 1994a ; Renault et al., 1995) ; 2) deux bactéries appartenant au groupe polyphylétique de *Vibrio splendidus* ont été isolées d'huîtres subissant des épisodes de mortalités estivales et ont induit des mortalités en infections expérimentales (Lacoste et al., 2001a ; Waechter et al., 2002). Cependant, Le Roux et al. (2002) ont analysé une collection de souches phénotypiquement apparentées à *Vibrio splendidus* et isolées d'huîtres subissant des épisodes de mortalités estivales (Annexe 1). Le résultat de cette étude épidémiologique montre que si des souches de *Vibrio* sont impliquées dans les phénomènes de mortalités estivales, il ne s'agit pas d'une souche ou d'une espèce unique.

En 2001, l'IFREMER a initié un programme pluridisciplinaire sur l'étude des mortalités estivales de l'huître creuse *C. gigas* (acronyme MOREST). Ce programme implique des équipes de généticiens, physiologistes, immunologistes, écophysiologistes, écotoxicologues et pathologistes. Il vise à caractériser les facteurs étiologiques des mortalités estivales par des études sur le terrain et en laboratoire et à proposer des solutions préventives.

I.4 - Moyens de lutte en aquaculture

Les maladies infectieuses représentent le principal frein au développement de l'aquaculture et engendrent de lourdes pertes économiques. De nombreuses méthodes de prévention,

diagnostic et traitement sont actuellement à l'étude afin de limiter les grandes variations de production dues aux épizooties. La vaccination est largement utilisée pour les élevages de poissons (Norqvist et al., 1989 ; Fouz et al., 2001 ; Bowden et al., 2002 ; Morinigo et al., 2002 ; McLauchlan et al., 2003). Cette technique n'est pas utilisable pour la culture des mollusques bivalves puisque ceux-ci ne possèdent pas de réponse immunitaire adaptative. Les immunostimulants augmentent la résistance à des agents infectieux en augmentant les mécanismes de défense non-spécifique (Sakai, 1999). Diverses substances (ovoglobuline, résidus solides de levure, produits de la pharmacopée traditionnelle chinoise) ont été testées, et certaines ont permis de réduire les taux de mortalité ou d'augmenter certains paramètres immunitaires tels la concentration hémocytaire, le taux de phénoloxydase et l'activité bactéricide des hémocytes (Takahashi et al., 2000 ; Thanardkit et al., 2002 ; Jian & Wu, 2003). L'efficacité de ces produits est cependant parfois remise en cause, ce qui laisse un doute quant à leur utilisation en aquaculture (Bachère, 2003). Le diagnostic reste un des meilleurs moyens de prévention des épisodes de mortalité dus à des agents infectieux. Grâce à l'apport de la biologie moléculaire, des outils plus sensibles et plus spécifiques ont été développés (Mialhe et al., 1995). Entre autres, des sondes pour la PCR et l'hybridation *in situ* ont été mises au point pour la détection de *Bonamia ostreae*, de *Marteilia refringens*, de l'herpèsvirus OsHV1 (Le Roux et al., 1999 ; Cochenec et al., 2000 ; Renault et al., 2000b). A ce jour, les méthodes utilisées ou potentiellement utilisables pour l'élevage de mollusques sont la modification des conditions d'élevage, la sélection d'animaux génétiquement résistants aux maladies, les antibiotiques et les probiotiques.

1.4.1 - Pratiques d'élevage

Les hautes densités pratiquées dans les élevages favorisent la propagation des agents infectieux. La modification des pratiques culturelles peut aider à contrôler des épizooties. Ainsi, *M. refringens*, parasite d'*O. edulis* n'affecte que les élevages situés dans les baies et les estuaires. Le déplacement des cheptels vers des eaux plus profondes permet d'éviter leur contamination (Grizel, 1997). En pleine mer ou sur estran, les qualités physico-chimiques de l'eau et la présence de polluants ou d'agents pathogènes ne peuvent pas être contrôlées. En revanche, en éclosérie-nurserie, différentes techniques (filtration, renouvellement de l'eau, contrôle de l'alimentation) ont été développées pour améliorer l'élevage (Robert & Gerard, 1999). Des traitements électrolytiques, aux UV ou à l'ozone peuvent être utilisés pour

éliminer ou réduire les agents pathogènes présents dans l'eau (Sugita et al., 1992 ; Liltved et al., 1995 ; Jorquera et al., 2002).

1.4.2 - Sélection génétique

Une autre technique de prévention des maladies infectieuses est la sélection de souches ou de familles résistantes. A Tahiti, la majorité des élevages de crevettes utilise une souche de *Penaeus stylirostris* tolérante au virus de nécrose hématopoïétique. Celle-ci est porteuse du virus mais ne développe pas le syndrome associé (Bedier et al., 1998). Un programme de sélection de familles d'huîtres plates, *O. edulis*, tolérantes au parasite *B. ostreae* a été initié au début des années 90. Plusieurs familles ont été identifiées, et leur descendance présente une tolérance accrue vis-à-vis du parasite (Naciri-Graven et al., 1998 ; Lapègue et al., 2003). Cependant, les facteurs intervenant dans la tolérance à une maladie donnée sont généralement inconnus. De plus, une sensibilité accrue vis-à-vis d'autres agents pathogènes (Dorson & Quillet, com. pers.) et une baisse des performances de croissance (Beattie, 1985) ont parfois été constatées.

1.4.3 - Antibiotiques

Les antibiotiques ont été largement utilisés en traitement et en prévention des infections bactériennes en médecine humaine et vétérinaire depuis les années 1940. Ces utilisations abusives ont rapidement entraîné l'apparition de résistances (Schmidt et al., 2001 ; Miranda & Zemelman, 2002). A ce jour, l'utilisation des antibiotiques à spectre large est déconseillée, voire interdite pour les productions animales afin de limiter le développement et le transfert de résistance à des pathogènes humains. D'autre part, l'élevage des mollusques se fait en milieu ouvert ce qui rend l'utilisation de ces substances irréalisable. En revanche, les conditions d'élevage intensif en milieu confiné favorisant le développement d'agents pathogènes, les antibiotiques sont utilisés en routine pour les élevages larvaires de certains bivalves (Nicolas et al., 1996).

1.4.4 - Probiotiques

Les probiotiques sont définis comme des adjuvants microbiens vivants ayant un effet bénéfique sur l'hôte en modifiant sa flore microbienne, en assurant une utilisation optimisée de l'alimentation, en augmentant la réponse de l'hôte vis-à-vis d'un agent pathogène ou en

améliorant la qualité de son environnement. Metchnikoff (1907) fut le premier à émettre l'hypothèse d'une influence positive des bactéries ingérées sur la flore intestinale normale. En revanche, l'évaluation de ces techniques en aquaculture est assez récente (Dopazo et al., 1988 ; Douillet & Langdon, 1994). Suite aux limitations d'utilisation des antibiotiques, de nombreuses études font état d'essais d'utilisation des probiotiques en aquaculture (pour revue, voir Verschuere et al., 2000b ; Irianto & Austin, 2002a). De nombreux genres bactériens sont testés, par rapport à leur présence naturelle dans l'environnement des animaux (*Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*) ou par rapport à leurs propriétés antibactériennes décrites chez d'autres animaux (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus*). Les principaux modes d'action des probiotiques sont : production de substances antibactériennes (Shehane & Sizemore, 2002), compétition pour les sites de colonisation (Joeborn et al., 1997 ; Ringo & Vadstein, 1998) ou les nutriments (Rico-Mora et al., 1998 ; Holmstrom & Gram, 2003) et/ou stimulation de l'immunité de l'hôte (Rengpipat et al., 2000 ; Irianto & Austin, 2002b). Des essais en structures d'élevage ont permis de valider la capacité inhibitrice de quelques unes de ces souches probiotiques (Smith & Davey, 1993 ; Austin et al., 1995 ; Gatesoupe, 1997 ; Gram et al., 1999). Pour la production de crevettes, la flore de *Vibrio* luminescents a été comparée dans 2 structures de pénaiculture utilisant l'eau d'une même provenance mais l'une étant traitée avec une souche de *Bacillus* probiotique et l'autre non. La quantité totale de *Vibrio* luminescents dans l'eau et les sédiments était largement diminuée en présence de la souche de *Bacillus* (Moriarty, 1998). Pour la conchyliculture, Riquelme et al. (2001) ont testé l'ajout d'un mélange de *Vibrio* sp. C33, *Pseudomonas* sp. 11 et *Bacillus* sp. B2 à des cultures en masse de larves d'*Argopecten purpuratus*. Ainsi, pour cet élevage larvaire, la présence de ces bactéries a permis d'éviter l'utilisation d'antibiotiques, qui sont normalement ajoutés en routine pour maintenir des productions stables. Cependant, ce type de traitement nécessite de nombreuses précautions et donc de nombreuses études préalables *in vivo* concernant la virulence potentielle de la souche probiotique, son maintien dans l'environnement ou dans l'organisme de l'animal et son action réelle sur le pathogène (Verschuere et al., 2000b).

II - Le genre *Vibrio*

Les bactéries du genre *Vibrio* appartiennent à la famille des *Vibrionaceae*, classe des γ -Protéobactéries. Ce sont des bacilles généralement isolés, Gram négatif, droits ou incurvés, majoritairement mobiles. Elles sont chimioorganotrophes, aérobies-anaérobies facultatifs et possèdent un métabolisme respiratoire et fermentatif ainsi que, pour la plupart des espèces, une oxydase. Ce sont des bactéries halophiles, isolées d'environnements aquatiques et généralement capables de croître sur milieu TCBS (Thiosulfate citrate bile saccharose). La composition en bases G-C de leur ADN est de l'ordre de 38-51 mol% (Baumann et al., 1980 ; Baumann & Schubert, 1984).

II.1 - Taxonomie

Depuis l'identification (Pacini, 1854) et l'isolement (Koch, 1884) de l'agent du choléra, *Vibrio cholerae*, nommé à l'origine *Vibrio comma*, la taxonomie du genre *Vibrio* a été modifiée de nombreuses fois, en fonction de l'évolution des techniques d'identification. Les premiers critères d'identification ont été d'ordre phénotypique (morphologie, mode de groupement, métabolisme des sucres, présence d'enzymes, (Baumann et al., 1971)). Ces résultats phénotypiques sont utilisés soit en effectuant des analyses en taxonomie numérique (Ortigosa et al., 1989 ; Ortigosa et al., 1994 ; Farto et al., 1999 ; Montes et al., 1999), soit en établissant des clés dichotomiques. Cette dernière approche a été appliquée aux 37 espèces de *Vibrio* décrites en 1994 par (Alsina & Blanch, 1994b ; a). Les techniques de biologie moléculaire telles que les analyses phylogénétiques et les hybridations ADN/ADN permettent d'affiner la classification de la famille des *Vibrionaceae* (Véron, 1965). Les hybridations ADN/ADN permettent de comparer de façon quantitative les génomes de 2 souches de bactéries. En bactériologie, deux souches appartiennent à la même espèce si le taux d'hybridation entre leurs génomes est supérieur à 70 % (Grimont, 1984). Plusieurs études de taxonomie, le plus souvent concordantes entre elles, ont été basées sur les séquences des gènes des ARN 16S et 5S d'espèces appartenant aux genres *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* et *Plesiomonas* et à d'autres groupes des γ -Protéobactéries (MacDonell et Colwell, 1985 ; Kita-Tsukamoto et al., 1993 ; Ruimy et al., 1994). Les principaux résultats sont : 1) les 4 genres étudiés appartiennent bien à la sous classe des γ -Protéobactéries (Stackebrandt et al., 1988) ; 2) les bactéries du genre *Aeromonas* devraient être placées dans une famille à part ; 3) l'espèce *Plesiomonas shigelloides* est plus proche de la famille des *Enterobacteriaceae* que des

Vibrionaceae; 4) les techniques utilisées ne permettent pas de différencier les genres *Vibrio* et *Listonella*, ces deux appellations subsistent ; 5) la famille des *Vibrionaceae* ne doit contenir que les genres *Vibrio* et *Photobacterium*. En 1996 et 1998, les genres *Salinivibrio* et *Moritella* ont été inclus dans la famille des *Vibrionaceae*, chacun ne comportant qu'une espèce (Mellado et al., 1996 ; Urakawa et al., 1998).

L'édition de 1984 du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Baumann & Schubert, 1984) décrit 27 espèces de *Vibrio* (dont 7 espèces ajoutées juste avant l'impression) alors que l'édition de 1991 de "The Prokaryotes" fait état de 33 (Farmer III & Hickman-Brenner, 1991). A ce jour, 61 espèces de *Vibrio* ont été décrites (Euzéby, 2004). Thompson et al. (2001) ont publié l'analyse par FAFLP (Polymorphisme de longueur de fragments amplifiés) d'une collection de 506 souches de *Vibrio* isolées principalement de milieux ou d'organismes marins. Cette technique s'est avérée avoir une bonne corrélation avec les résultats d'hybridation ADN/ADN et est utilisée comme outil d'identification et de typage (Janssen et al., 1996 ; Mougél et al., 2002 ; Sawabe et al., 2002). Trois catégories de groupes ont été définies : 1) les souches regroupées avec une souche type connue et donc assignées à l'espèce de la souche type; 2) les souches non regroupées avec une souche type connue et considérées comme constituant potentiellement de nouvelles espèces et 3) les souches regroupées avec plus d'une souche type connue, ces derniers groupes étant caractérisés au cas par cas. Les souches apparentées à *V. splendidus* présentent une grande variété de motifs en FAFLP. Les groupes de la seconde catégorie représentent potentiellement de nouveaux taxons, résultat concordant avec de précédentes études faisant état de groupes non identifiés (Maugeri et al., 2000 ; Alcaide, 2003). Des analyses polyphasiques complémentaires ont ainsi permis la description de 15 nouvelles espèces et d'un nouveau genre (*Enterovibrio*) ainsi que la reclassification de *Vibrio hollisae* en *Grimontia hollisae* (Thompson, 2003).

En parallèle, une étude sur la taxonomie et les relations phylogénétiques des souches apparentées à *V. splendidus* a été entreprise dès 1995 au Laboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER La Tremblade. Au cours de sa thèse, Waechter (2001) a isolé une souche phénotypiquement proche de *V. splendidus* induisant des mortalités en infection expérimentale. L'analyse phylogénétique basée sur le gène codant pour l'ARN 16S pour cette souche semble indiquer l'existence de groupes distincts au sein de l'espèce *V. splendidus* (Waechter et al., 2002). Cependant, il semble que l'ARN 16S soit plus adapté pour les analyses phylogénétiques entre souches éloignées (Gupta, 1998). De ce fait, la diversité génétique de souches phénotypiquement apparentées à *V. splendidus* et isolées d'épisodes de mortalité de *C. gigas* a été évaluée en utilisant d'autres gènes précédemment décrits pour des

analyses de souches phylogénétiquement proches (Yamamoto & Harayama, 1995 ; 1998). Trois gènes (16S, *gyrB*, *rpoD*) ont été analysés en PCR-RFLP avec 2 enzymes de restriction (HhaI, MboI). Les souches avec les profils de restriction les plus proches de celui de la souche pathogène ont été testées en infection expérimentale. Une grande variabilité de virulence au sein de la collection de souches a été observée. Ces résultats semblent donc congruents avec l'hypothèse précédente, à savoir que l'ensemble des souches regroupées dans l'espèce *V. splendidus* présente une grande variabilité, tant au niveau génotypique qu'au niveau de leur virulence. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans Aquatic Living Resources, présentée en Annexe 1 (Le Roux et al., 2002).

Cette étude montre que les outils de taxonomie phénotypique ne sont pas suffisants pour des souches proches de *V. splendidus*. Une approche polyphasique a été choisie pour clarifier les positions taxonomiques de souches isolées d'épisodes de mortalité. Elle comprenait l'analyse de caractères phénotypiques en taxonomie numérique, des analyses phylogénétiques basées sur les séquences des gènes de l'ARN 16S et *gyrB* et des hybridations ADN/ADN. Les souches testées présentaient plus de 70 % de similitude pour les 80 tests physiologiques dont 19 étaient discriminants. L'analyse phylogénétique basée sur le gène de l'ARN 16S a séparé les souches en 2 clades distincts : un comprenant la souche type de *Vibrio chagasii* et l'autre comprenant l'ensemble des autres souches apparentées à *V. splendidus*. L'analyse phylogénétique basée sur le gène *gyrB* a séparé les souches en 5 clades distincts : le premier contenait la souche type de *V. chagasii*, le troisième celle de *V. splendidus*, le quatrième celle de *Vibrio lentus*, le cinquième celles de *Vibrio kanaloae*, *Vibrio pomeroyi* et *Vibrio tasmaniensis*, le deuxième clade ne contenant pas de souche type. Ces résultats étaient congruents avec les hybridations ADN/ADN effectuées qui distinguaient 3 espèces distinctes entre le clade contenant *V. chagasii*^T, celui contenant *V. splendidus*^T et celui contenant *V. lentus*^T. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans Diseases of Aquatic Organisms présentée en Annexe 2 (Le Roux et al., 2004).

Le deuxième clade comporte en fait plusieurs nouvelles espèces. Ainsi, la description de *Vibrio crassostreae*, suite à une analyse polyphasique (taxonomie numérique, analyses phylogénétiques, hybridations ADN/ADN) est présentée dans une publication (Annexe 3), acceptée dans l'International Journal of Systematic and Environmental Microbiology (Faury et al., 2004)

II.2 - Ecologie

La population des procaryotes est estimée à 4-6. 10^{30} cellules dont 3,6. 10^{30} sont réparties dans le milieu aquatique marin (Whitman et al., 1998). La proportion des bactéries cultivables en laboratoire est évaluée à moins de 1 %. Des techniques de biologie moléculaire (séquençage du gène 16S sans étape préalable de culture) ont permis de montrer l'importante diversité des communautés bactériennes marines (Fuhrman et al., 1993), ce qui laisse supposer que les groupes connus ne constituent en fait qu'une part négligeable de la flore bactérienne.

Peu d'études à grande échelle font état de la proportion de bactéries appartenant au genre *Vibrio* par rapport au reste de la flore bactérienne d'un milieu donné. Les plus fortes concentrations de *Vibrio* sont généralement observées pendant l'été (Barbieri et al., 1999 ; Heidelberg et al., 2002b ; a), conséquence de l'augmentation de la température qui est alors proche des températures optimales de croissance des souches de *Vibrio* (18-25°C) et de l'augmentation en nutriments disponibles. Ainsi, Barbieri et al. (1999) ont évalué l'abondance de souches de *Vibrio* dans les eaux de deux estuaires de la côte adriatique entre avril et octobre. Les concentrations en *Vibrio*, d'après énumération sur TCBS, variaient de 10^3 (avril) à 10^6 (août) UFC.L⁻¹. Cependant, ces valeurs n'ont pas été comparées à celles de la flore bactérienne totale. Heidelberg et al. (2002b) ont décrit les variations quantitatives et qualitatives de la flore bactérienne de la Baie de Chesapeake d'avril à décembre par comptage après coloration à l'acridine orange et par hybridation *in situ* fluorescente (FISH). La concentration de *Vibrio* – *Photobacterium* variait de $1,7.10^7$ à $2,1.10^8$ cellules.L⁻¹, le maximum étant au cours de l'été. Ces concentrations représentaient de 0,5 à 4% de la flore bactérienne totale. *Vibrio parahaemolyticus* n'est pas détecté dans la colonne d'eau au cours des mois hivernaux. A cette période, il est présent en faible quantité dans les sédiments à partir desquels ils réintègrent la colonne d'eau au printemps (Kaneko & Colwell, 1978).

La variation des populations bactériennes peut être influencée par la prédation par des organismes eucaryotes (Beardsley et al., 2003) et par la présence de bactériophages (DePaola et al., 1998) qui peuvent entraîner des mortalités équivalentes à celles dues à la prédation. Un concept a été élaboré selon lequel des virus lytiques peuvent contrôler les populations de bactéries dominantes, permettre ainsi la co-existence de populations moins compétitives et maintenir une diversité bactérienne (Weinbauer & Rassoulzadegan, 2004). Vivant dans des zones où les concentrations en nutriments sont très variables, les bactéries du genre *Vibrio* ont la capacité de survivre pendant de longues périodes en milieu carencé et de reprendre

rapidement une croissance quand des nutriments sont de nouveau présents dans le milieu (Nystrom et al., 1990).

D'une façon générale, les cellules de *Vibrio* sont présentes en plus grandes quantités liées à divers substrats (végétaux, animaux, particules pélagiques ...) que libres dans la colonne d'eau. Lors d'une étude sur la répartition de *V. cholerae*, de plus grandes quantités de cette espèce ont été isolées à partir de jacinthes d'eau par rapport aux concentrations observées dans l'eau environnante (Spira et al., 1981). De grandes quantités de *Vibrio* sont associées au zooplancton et particulièrement aux invertébrés recouverts d'un exosquelette chitineux (Sochard et al., 1979). Heidelberg et al. (2002a) ont décrit les variations qualitatives et quantitatives de la flore bactérienne associée au zooplancton entre avril et décembre. Le groupe des *Photobacterium - Vibrio* représentait de 1 à 26 % (soit de $1,6.10^2$ à $1,2.10^5$ cellules par individu) de la flore associée au zooplancton de plus de 202 μm et de 1,3 à 27 % (soit de 25 à $1,9.10^3$ cellules par individu) de la flore associée au zooplancton de moins de 202 μm . A ce jour, la signification des associations spécifiques entre les souches de *Vibrio* et crustacés n'est pas élucidée, mais des raisons d'ordre nutritif sont fortement suspectées, le genre *Vibrio* intervenant dans la minéralisation de la chitine en l'utilisant comme principale source de carbone et d'azote (Bassler et al., 1991).

Les animaux élevés en aquaculture (poissons, mollusques et crustacés) présentent de fortes concentrations de cellules de *Vibrio*. Lovelace et al. (1968) ont décrit le genre *Vibrio* comme étant souvent le plus abondant dans la flore cultivable de l'eau intervalvaire et dans celle associée aux branchies de *C. virginica*. Cependant de nombreuses études font état de la population de cellules de *Vibrio* par rapport à la flore cultivable, donc sans indication de proportion absolue par rapport à la flore totale présente dans ces animaux. Les quantités de bactéries isolées à partir des mollusques sont toujours supérieures à celles obtenues à partir de l'eau de mer. Ceci est dû aux grandes quantités de bactéries présentes dans le tube digestif alors que les autres organes (branchies, manteau et muscle adducteur) présentent des quantités équivalentes à l'eau de mer (Kueh & Chan, 1985). Les souches de *Vibrio* sont majoritaires dans les diverticules digestifs de l'huître. La flore bactérienne de l'estomac est très proche de celle de l'eau de mer et la similitude diminue le long du tractus digestif. Les différences quantitatives et qualitatives observées entre les flores des mollusques et de l'eau de mer suggèrent l'existence de flores commensales spécifiques associées aux mollusques bivalves (Prieur, 1981 ; Pujalte et al., 1999 ; Maugeri et al., 2000). Pujalte et al. (1999) ont suivi les fluctuations des populations de bactéries hétérotrophes cultivables dans des huîtres et dans

l'eau de mer. Le groupe *Vibrio* – *Photobacterium* dominait la flore des huîtres de mars à octobre, atteignant jusqu'à 100 % de la flore cultivable (soit $1,7$ à $3,4 \cdot 10^6$ UFC.g⁻¹ d'huître), alors qu'il ne dominait la flore de l'eau de mer que pour les mois de juin, juillet et septembre (avec un maximum de $1,6 \cdot 10^2$ UFC.mL⁻¹, soit 33 à 40 % de la flore cultivable). La flore intestinale des poissons d'élevage est également dominée par les souches de *Vibrio*. Lors d'une étude sur la flore intestinale de daurades, *Sparus aurata*, aux stades larvaires et juvéniles, Grisez et al. (1997) ont montré que pendant la phase de développement larvaire, quelle que soit l'alimentation (rotifères ou *Artemia*), la flore intestinale reflétait la flore contenue dans l'alimentation. La flore intestinale ne devenait spécifique qu'à partir de la fin du stade larvaire et était alors très majoritairement composée de souches de *Vibrio*. Certains organes sont spécifiquement colonisés par certaines espèces de *Vibrio*, tel les organes lumineux du calmar par *Vibrio fischeri* (McFall-Ngai & Ruby, 2000).

Les relations entre les mollusques d'élevage et leur flore *Vibrionaceae* peuvent être d'ordre commensal, bénéfique, symbiotique ou pathogène et sont décrites dans la dernière partie de ces données bibliographiques.

II.3 - Pathogénicité

Parmi les bactéries du genre *Vibrio*, de nombreuses espèces sont pathogènes pour l'homme et/ou pour les animaux aquatiques sauvages ou d'élevage (poissons, crustacés, mollusques, reptiles, échinodermes, cnidaires et végétaux). Les divers symptômes associés aux infections dues à des espèces de *Vibrio* sont largement décrits dans la littérature : gastro-entérites, septicémies, infections de plaies, ulcères et hémorragies. Les mécanismes de virulence impliqués sont variés et n'ont pas toujours été décrits, même si les grandes étapes sont souvent similaires (pénétration, colonisation, multiplication, ...). La recherche de facteurs de virulence nécessite plusieurs étapes et certaines précautions. La seule présence d'un gène dans le génome de la bactérie ou la mise en évidence d'activités extracellulaires en milieu de culture ou sur des modèles *in vitro* ne permet pas d'évaluer l'implication réelle de ces facteurs dans la pathogénicité (Janda et al., 1988). A ce jour, de nombreuses études sur les facteurs de virulence reposent sur la version moléculaire du postulat de Koch : un facteur de virulence est considéré comme intervenant dans la pathogénicité d'une bactérie si une mutation sur le gène codant pour celui-ci entraîne une diminution de la virulence alors que la complémentation d'une souche non virulente (ou du mutant) par ce gène la rend pathogène (Falkow, 1988). Cependant, certains facteurs de virulence pourraient être dus à des ensembles de gènes

redondants ou compensatoires (Jeong et al., 2000), et la mutation d'un gène peut entraîner de nombreuses modifications si la protéine a des propriétés régulatrices. Enfin, certains facteurs de virulence sont exprimés uniquement dans des conditions environnementales spécifiques, ce qui rend leur expression faible voire nulle en condition de laboratoire. La reproduction de tout ou partie des symptômes *in vivo* après purification partielle ou totale du facteur de virulence putatif permet généralement de statuer sur l'implication de cette substance dans la pathogénicité (Kodama et al., 1984 ; Esteve et al., 1995 ; Farto et al., 2002).

11.3.1 - Chez l'homme

L'espèce type du genre *Vibrio* est *V. cholerae*, agent étiologique du choléra. Onze autres espèces sont associées à des pathologies humaines : *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio carchariae*, *Vibrio cincinnatiensis*, *Vibrio damsela*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *V. hollisae*, *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio mimicus*, *V. parahaemolyticus* et *Vibrio vulnificus* (Baumann & Schubert, 1984 ; Farmer III & Hickman-Brenner, 1991). Ces agents pathogènes agissent en induisant des gastro-entérites et/ou en infectant des plaies et/ou en provoquant des septicémies. Le Tableau 1 résume les différents symptômes associés à chaque espèce.

Tableau 1. Symptômes associés aux différentes espèces de *Vibrio* pathogènes pour l'homme (Janda et al., 1988 ; Miossec, 2002)

Agent pathogène	Gastro-entérite	Blessure infectée	Otite	Septicémie	Références
<i>V. alginolyticus</i>	?	++	++	+	(Schmidt et al., 1979)
<i>V. carchariae</i>		+			(Pavia et al., 1989)
<i>V. cholerae</i> O1	+++	+			(Sack et al., 2004)
<i>V. cholerae</i> non O1	+++	++	+	++	(Janda et al., 1988)
<i>V. cincinnatiensis</i>				+	(Brayton et al., 1986)
<i>V. damsela</i>		+++			(Morris et al., 1982)
<i>V. fluvialis</i>	+++				(Hickman-Brenner et al., 1984)
<i>V. furnissii</i>	?				(Hickman-Brenner et al., 1984)
<i>V. hollisae</i>	+++			+	(Hickman et al., 1982)
<i>V. metschnikovii</i>	?			?	(Magalhaes et al., 1996)
<i>V. mimicus</i>	+++		+		(Davis et al., 1981)
<i>V. parahaemolyticus</i>	+++	+	+		(Tison & Kelly, 1984 ; Doyle, 1990)
<i>V. vulnificus</i>	+	+		++	(Blake et al., 1979)

La grande majorité des gastro-entérites a pour origine la consommation de produits de la mer crus (coquillages, crustacés et poissons). Les septicémies se produisent généralement après

consommation de ces mêmes produits et principalement chez des individus immuno-déprimés ou présentant un dysfonctionnement hépatique (Janda et al., 1988 ; Miossec, 2002). Malgré l'identification de nombreux facteurs de virulence chez plusieurs espèces, les mécanismes de pathogénicité n'ont été entièrement décrits que pour *V. cholerae*.

V. cholerae mis à part, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* sont les plus connues et entraînent les plus grands risques en santé publique. Les principaux facteurs de virulence de ces deux espèces sont identifiés, mais la pathogénèse n'est pas entièrement décrite. Chez *V. vulnificus*, la virulence est conditionnée par l'expression de la capsule polysaccharidique. Celle-ci est corrélée à la résistance à la phagocytose et aux activités bactéricides du sérum, à la stimulation de la sécrétion de cytokines et à la formation de colonies opaques (Tamplin et al., 1985 ; Yoshida et al., 1985 ; Shinoda et al., 1987 ; Simpson et al., 1987 ; Powell et al., 1997). La virulence de *V. parahaemolyticus* est majoritairement due à la production d'hémolysine. Deux types ont été décrits pour cette espèce : une hémolysine thermostable directe (nommée TDH pour Thermostable Direct Hemolysin) et une hémolysine proche de la TDH (nommée TRH pour "TDH-Related Hemolysin"), toutes deux présentent une activité hémolytique, entérotoxique, cytotoxique et cardiotoxique (Miyamoto et al., 1969 ; Honda et al., 1989 ; Honda et al., 1992 ; Raimondi et al., 2000). Les souches isolées d'échantillons cliniques produisent au moins une des deux. Des sondes spécifiques de la TDH et de la TRH ont été mises au point et permettent une détection rapide et spécifique des souches potentiellement pathogènes (DePaola et al., 2003 ; Hara-Kudo et al., 2003).

L'espèce *V. cholerae* est composée de plus de 200 sérogroupes, parmi lesquels seuls O1 et O139 induisent les pathologies cholériques. Les autres sérogroupes sont impliqués dans des infections rares et de faible importance clinique. Bien que la bactérie responsable du choléra n'ait été identifiée et cultivée qu'à la fin du 19^{ème} siècle (Pacini, 1854 ; Koch, 1884), la première description d'une épidémie de choléra date de 1817. Depuis, 7 pandémies ont affecté certaines régions ou la totalité du globe. Les souches de *V. cholerae*, toxinogéniques ou non, sont présentes dans l'environnement aquatique, principalement associées à des végétaux, des crustacés et des insectes. Les individus sont contaminés suite à l'absorption d'eau ou d'aliments contaminés. La dissémination de l'épidémie est souvent due à la contamination fécale du milieu marin et par conséquent des produits de la mer. Les symptômes apparaissent entre 18 h et 5 j après la contamination (Sack et al., 2004). Leur intensité varie en fonction du statut immunitaire intestinal, de la taille de l'inoculum, de l'état de la barrière gastrique acide et du groupe sanguin (le groupe O étant plus sensible). Le choléra résulte d'un

processus multifactoriel débutant avec la colonisation de l'intestin grêle. Les bactéries adhèrent à la bordure en brosse des entérocytes par des pili de type IV constitués de la protéine TCP (Toxin Coregulated Pilus). Le gène de la TCP (*tcpA*) fait partie d'un îlot de pathogénicité présent sur un des deux chromosomes des souches pathogènes de *V. cholerae* (Karaolis et al., 1998). L'origine de cet îlot de pathogénicité pourrait être un bactériophage. Il comprend des gènes impliqués dans la colonisation de l'hôte ainsi que le système de régulation de l'expression de facteurs de virulence. D'autres facteurs tels que les hémagglutinines et les protéines extramembranaires augmentent l'adhésion et la colonisation. L'étape suivante est la production de toxines dont la plus étudiée est la toxine cholérique (CT). Elle est composée de 5 sous-unités B et d'une sous-unité A qui, en pénétrant dans la cellule épithéliale, active l'adénylate cyclase. Ceci augmente la production d'AMP cyclique et la sécrétion de chlorure dans les cellules cryptiques et inhibe l'absorption de chlorure de sodium par les cellules du villum. L'efflux massif de liquide et de sels minéraux dans l'intestin grêle provoque des diarrhées importantes. La perte de liquide isotonique riche en électrolytes induit une diminution du volume sanguin et de la pression sanguine, pouvant provoquer un état de choc, voire le décès des malades. Le gène de la toxine cholérique est porté par un bactériophage, nommé CTX Φ (Waldor & Mekalanos, 1996). CTX Φ utilise la protéine TCP comme récepteur et son génome est intégré dans le génome bactérien sous forme de prophage. Une fois les gènes des facteurs de virulence (TCP et CT) acquis, leur expression est régulée par un ensemble de gènes en fonction des conditions environnementales (induction dans le milieu intestinal). Les gènes des facteurs de régulation sont présents dans l'îlot de pathogénicité ou dans le prophage issu du phage satellite RS1 (Davis et al., 2002). Les souches de *V. cholerae* responsables des épidémies possèdent d'autres facteurs de virulence tels que les composés de surfaces (lipopolysaccharides, protéines extramembranaires), les neuraminidases et les protéases (hémolysines). Cependant, la régulation et l'importance de ces facteurs sont encore inconnus. Certains pourraient intervenir dans d'autres phases du cycle biologique de *V. cholerae*.

11.3.2 - Chez les organismes aquatiques

11.3.2.1 - Poissons

Dans la 3^{ème} édition de "Bacterial Fish Pathogens" (1999), Austin et Austin décrivent quinze espèces appartenant au genre *Vibrio* pathogènes de poissons : *V. alginolyticus*,

Vibrio anguillarum, *V. cholerae* non O1, *V. fischeri*, *V. furnissii*, *Vibrio harveyi* (et son synonyme *V. carchariae*), *Vibrio ichthyenteri*, *Vibrio logei*, *Vibrio ordalii*, *Vibrio pelagius*, *Vibrio salmonicida*, *V. splendidus*, *Vibrio trachuri*, "*Vibrio viscosus*" et *V. vulnificus*. Le tableau 2 regroupe les différentes espèces de *Vibrio* pathogènes de poissons, leurs principaux hôtes et lésions.

Tableau 2. Espèces de *Vibrio* pathogènes de poissons d'après (Austin & Austin, 1999)

Agent pathogène	Symptômes	Espèces hôte
<i>V. alginolyticus</i>	Septicémie, infection de l'œil, hémorragies internes et externes, ulcères de la peau	<i>Sparus aurata</i> , <i>Epinephelus malabanicus</i>
<i>V. anguillarum</i>	Septicémie, hémorragies internes et externes, nécrose des organes internes	Majorité des poissons marins
<i>V. cholerae</i> non O1	Septicémie, lésions de la peau	<i>Carassius aurata</i> , <i>Plecoglossus altivelis</i>
<i>V. fischeri</i>	Tumeurs viscérales, papillomes de la peau	<i>Sparus aurata</i> , <i>Scophthalmus maximus</i>
<i>V. furnissii</i>	Hémorragies internes, hypersécrétion de mucus	<i>Anguilla anguilla</i>
<i>V. harveyi</i>	Infection de l'œil, vasculite, gastro-entérite, ulcères de la peau, lésions hémorragiques (nageoires, bouche)	<i>Sparus aurata</i> , <i>Centropomus undecimalis</i> , <i>Carcharhinus plumbeus</i> , <i>Negaprion brevirostris</i> , <i>Scophthalmus maximus</i> , <i>Epinephelus malabanicus</i> , <i>Epinephelus tauvina</i> , <i>Acanthopagrus cuvieri</i> , <i>Mola mola</i> , <i>Solea senegalensis</i> , <i>Chanos chanos</i>
<i>V. ichthyenteri</i>	Nécrose intestinale	<i>Paralichthys olivaceus</i>
<i>V. logei</i>	Lésions de la peau	<i>Salmo alar</i>
<i>V. ordalii</i>	Septicémie, hémorragies	Majorité des poissons marins
<i>V. pelagius</i>	Nécrose, infiltration des organes internes,	<i>Scophthalmus maximus</i>
<i>V. salmonicida</i>	Hémorragies internes et externes, ascites, septicémie, nécrose des organes internes	<i>Salmo alar</i> , <i>Gadus morhua</i> , <i>Hippoglossus hippoglossus</i>
<i>V. splendidus</i>	Septicémie, ulcères de la peau, ascites, hémorragies (nageoires, queue), nécrose et hémorragies des organes internes	<i>Scophthalmus maximus</i> , <i>Sparus aurata</i> , <i>Colistium nudipinnis</i> , <i>Colistium guntheri</i> , <i>Trachurus japonicus</i>
<i>V. trachuri</i>	Septicémie, hémorragies	<i>Trachurus japonicus</i>
" <i>V. viscosus</i> "	Ulcères	<i>Salmo alar</i>
<i>V. vulnificus</i>	Septicémie, hémorragies externes (œil, nageoires)	<i>Anguilla anguilla</i> , <i>Sarotherodon niloticus</i>

Certaines espèces de *Vibrio* ne sont pathogènes que d'une espèce alors que d'autres infectent une grande variété d'espèces voire de familles. Ainsi, *V. harveyi* est pathogène de téléostéens (*Sparus aurata*, *Centropomus undecimalis*, *Negaprion brevirostris*, *Scophthalmus maximus*, *Epinephelus malabanicus*, *Epinephelus tauvina*, *Acanthopagrus cuvieri*, *Solea senegalensis*,

(Lamas et al., 1990 ; Saeed, 1995 ; Yii et al., 1997 ; Lee et al., 1999 ; Zorrilla et al., 2003) et de sélaciens (*Carcharhinus plumbeus* (Grimes et al., 1984) et *V. ichthyenteri* n'a été décrit que chez *Paralichthys olivaceus* (Ishimaru et al., 1996). De même, certaines espèces de poissons peuvent être infectées par différentes espèces de *Vibrio* alors que d'autres ne sont décrites comme infectées que par une seule espèce. L'anguille, *Anguilla anguilla* peut être infectée par *V. anguillarum*, *V. furnissii* et *V. vulnificus* (Muroga et al., 1976 ; Esteve et al., 1995 ; Dalsgaard et al., 1999). Le requin, *Carcharhinus plumbeus*, seul sélacien décrit affecté par une vibriose, ne serait infecté que par *V. harveyi* (Grimes et al., 1984).

Les lésions les plus fréquentes sont des septicémies, des ulcères et/ou des hémorragies. L'adhésion au mucus est l'étape initiale de la plupart des vibrioses et est influencée par des facteurs environnementaux tels le pH et la salinité (Balebona et al., 1995 ; Bordas et al., 1996). De nombreux auteurs ont testé la toxicité des produits extracellulaires de souches de *Vibrio in vivo* et/ou *in vitro*, ceci probablement à cause de la facilité d'obtention de ces produits (Kodama et al., 1984 ; Esteve et al., 1995 ; Zorrilla et al., 2003). De ce fait, de nombreuses protéases ont été décrites chez des souches de *Vibrio*, intervenant probablement au niveau de l'invasion, de la colonisation et des altérations tissulaires (Lee et al., 1997 ; Farto et al., 2002).

La vibriose due à *V. anguillarum* chez l'anguille (*Anguilla anguilla*) est la première maladie bactérienne de poissons décrite. A ce jour, elle touche plus de 14 pays et 48 espèces de poissons élevés en eau de mer. Les épizooties se déclenchent en général à la faveur de températures élevées, entraînant une diminution du taux d'oxygène dissous dans l'eau. Les principaux symptômes sont ceux d'une septicémie hémorragique : décoloration de la peau, lésions nécrotiques rouges des muscles abdominaux, érythèmes à la base des nageoires, autour des orifices et dans la bouche, distension de l'intestin et du rectum remplis de liquide clair, exophtalmie et splénomégalie. Les analyses histologiques montrent des altérations du sang, du tissu conjonctif, des branchies, des reins, du foie et du tractus digestif postérieur. Les bactéries sont réparties dans tous les tissus affectés avec une forte concentration dans le sang (Austin & Austin, 1999). A ce jour, le mode d'infection n'est pas encore élucidé, mais il semble commencer par l'adhésion des bactéries à la peau via le mucus ou par une contamination orale, suivie de la pénétration de l'épithélium intestinal. La mobilité semble nécessaire pour la rencontre hôte-bactérie. Des mutants dépourvus de flagelline A, élément du flagelle, présentaient une forte diminution de leur virulence lors des infections expérimentales par balnéation, diminution moins importante lors des infections par injection intrapéritonéale. Ce résultat suggère que la mobilité des bactéries est nécessaire pour qu'elles traversent le

tégument du poisson (Milton et al., 1996). Un rôle primordial d'une métalloprotéase dépendante du zinc a d'abord été suspecté dans le mécanisme d'invasion de l'hôte (Norqvist et al., 1990). Cependant, il semble qu'en l'absence de cette métalloprotéase, d'autres protéases soient produites en compensation (Milton et al., 1992). Dans le cas d'une contamination par la peau, une fois celle-ci traversée, les bactéries peuvent rejoindre le flux sanguin pour envahir tout l'individu. Dans le cas d'une contamination par voie orale, les bactéries pénètrent dans l'épithélium de l'intestin antérieur par endocytose, sont libérées dans la lamina propria et gagnent le foie par la veine porte (Grisez et al., 1996). La survie et la prolifération des bactéries dans le sang reposent sur leur résistance aux propriétés bactéricides du sérum (Trust et al., 1981) et sur leurs mécanismes de séquestration du fer, ce dernier étant en partie dû à la présence du plasmide pJM1 chez les souches virulentes (Crosa, 1980 ; Walter et al., 1983). Le précurseur de l'anguibactine, sidérophore de *V. anguillarum*, est produit via des gènes situés sur le chromosome bactérien (Actis et al., 1986). Le plasmide pJM1 contient des gènes codant pour des protéines essentielles à la biosynthèse de l'anguibactine (histidine décarboxylase, acide 2,3-dihydroxybenzoïque AMP ligase, ...) ; pour des protéines de transport du fer (protéines FatA-D) et pour des récepteurs membranaires de l'anguibactine (protéine OM2) (Crosa & Hodges, 1981 ; Walter et al., 1983 ; Actis et al., 1985 ; Actis et al., 1995 ; Wertheimer et al., 1999 ; Di Lorenzo et al., 2003). Ce mécanisme de séquestration du fer permet à *V. anguillarum* d'utiliser le fer normalement lié, chez l'hôte, à des protéines à haute affinité pour le fer telles que la transferrine et la lactoferrine. Il semble que dans certains cas, le plasmide pJM1 ait été intégré au génome bactérien (Toranzo et al., 1983). Ce mécanisme n'est présent que chez le sérotype O1, alors que d'autres sérotypes (O2) possèdent également une forte pathogénicité (Davey et al., 1998). De nombreux autres facteurs de virulence sont impliqués dans la pathogénicité de *V. anguillarum*. Umbreit et Tripp (1975) ont décrit l'existence de substances toxiques liées aux cellules bactériennes et libérées dans le milieu, sans toutefois les caractériser. Munn (1978) a décrit l'activité hémolytique *in vitro* d'une souche de *V. anguillarum* et l'a rapprochée de l'anémie observée chez les poissons infectés. Kodama et al. (1985) ont caractérisé une toxine extracellulaire non associée à des activités hémolytique ou protéolytique. Denkin et Nelson (1999) ont décrit l'induction accrue d'une activité protéasique lors de la croissance de la bactérie dans du mucus de poisson. Plusieurs protéines de surface ont également été caractérisées, certaines intervenant dans le système de séquestration du fer (Actis et al., 1985 ; Norqvist & Wolf-Watz, 1993).

11.3.2.2 - Crustacés

Les principaux genres de crustacés touchés par des vibrioses sont les crevettes *Penaeus* et *Litopenaeus*. Cependant, quelques études font état d'infections de homards (*Homarus americanus* et *Jasus verreauxi*), d'écrevisses (*Cherax quadricarinatus*), de crabes (*Portunus trituberculatus*, *Paralithodes brevipes* et *Cancer pagurus*) et d'*Artemia* d'élevage (Bowser et al., 1981 ; Eaves & Ketterer, 1994 ; Muroga et al., 1994 ; Watanabe et al., 1999 ; Diggles et al., 2000 ; Verschuere et al., 2000a ; Vogan et al., 2002 ; Soto-Rodriguez et al., 2003). De nombreuses espèces de *Vibrio*, *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. harveyi*, *Vibrio nigripulchritudo*, *Vibrio penaeicida*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* sont associées à des mortalités de crevettes. Les espèces *V. harveyi*, *V. nigripulchritudo* et *V. penaeicida* sont les agents étiologiques d'importants épisodes de mortalité entraînant de lourdes conséquences économiques. *V. harveyi* est responsable de mortalités de larves dans les écloséries de crevettes et de juvéniles dans les fermes d'élevage (Saulnier et al., 2000 ; Muroga, 2001). Seules quelques souches de *V. harveyi* sont pathogènes, alors que cette espèce est fréquemment isolée de l'environnement marin. La virulence de cette bactérie est apparemment due à l'infection des souches par le bactériophage VHML (*Vibrio harveyi* myovirus like) qui induit une plus grande production d'hémolysine et de toxines. Ainsi, lors d'infections expérimentales sur crevettes, les souches infectées par ce bactériophage ont induit un plus fort taux de mortalité que les mêmes souches non infectées (Munro et al., 2003). *V. penaeicida* est l'agent étiologique du "Syndrome 93", maladie de la crevette *Penaeus stylirostris* et responsable de fortes pertes économiques en Nouvelle-Calédonie. Les crevettes sont sensibles à cette bactérie à partir du stade postlarve et les mortalités n'apparaissent qu'en saison fraîche (Goarant et al., 1998). En 1998, une pathologie due à l'espèce *V. nigripulchritudo* est apparue dans une structure d'élevage de crevettes en Nouvelle Calédonie (Goarant, 2000). Les produits extracellulaires de *V. penaeicida* et *V. nigripulchritudo* ont induit, en infection expérimentale, des mortalités chez les crevettes et des altérations des cellules ovariennes et des hémocytes *in vitro* (Goarant et al., 2000).

11.3.2.3 - Autres organismes

Le seul cas de vibriose recensé chez les plantes est la maladie "ice-ice" de la Rhodophyte *Kappaphycus alvarezii*, provoquée par la souche P11 de *Vibrio* (Largo et al., 1999).

Une souche de *V. alginolyticus* a été isolée à plusieurs reprises de lésions de la bouche et des voies respiratoires de tortues de mer, *Chelonia mydas* et *Caretta caretta*. De plus, ces

affections disparaissent avec un traitement antibiotique. Cependant, aucune infection expérimentale n'a été réalisée, et le rôle de cet agent pathogène n'est à ce jour que suspecté (Glazebrook et al., 1993).

Des lésions épidermiques muqueuses et des pertes de piquants ont été observées sur des oursins, *Paleopneustes cristatus*, prélevés à grande profondeur et maintenus en aquariums (Bauer & Young, 2000). Cette maladie est due à l'invasion du liquide coelomique par une souche de *V. alginolyticus* suite à sa pénétration par les lésions mécaniques provoquées lors du prélèvement. Des symptômes similaires ont été obtenus en infection expérimentale avec cette souche.

Deux nouvelles espèces, *Vibrio shilonii* et *Vibrio coralliilyticus*, ont été identifiées comme agent pathogène de coraux durs. Dans les deux cas, la pathologie est dépendante de la température (Banin et al., 2000 ; Rosenberg & Ben-Haim, 2002 ; Ben-Haim et al., 2003). *V. shilonii* est responsable du blanchissement du corail *Oculina patagonica*. Cette pathologie est due à une toxine extracellulaire bloquant la photosynthèse des zooxanthelles, algues symbiotiques du corail, et induisant leur lyse. Au cours de l'été 1999, de fortes mortalités de plusieurs espèces de gorgones ont été observées en Méditerranée (Martin et al., 2002). Cinq souches ont été phénotypiquement identifiées comme appartenant aux espèces *V. splendidus*, *V. pelagius* et *Vibrio campbellii* selon les clés d'Alsina et Blanch (1994b ; a). Elles ont permis de reproduire les lésions en infection expérimentale par baignade, pour des températures supérieures à 22 °C.

III - Les relations *Vibrio*/Mollusques

III.1 - Commensaux et/ou bénéfiques

Les bactéries du genre *Vibrio* sont présentes sur la coquille, dans l'eau intervalvaire, dans l'hémolymphe et dans le tractus digestif des mollusques. Elles constituent une grande proportion de la flore bactérienne cultivable associée aux mollusques, quelles que soient les conditions environnementales.

Le calmar hawaïen *Euprymna scolopes* possède un organe lumineux, situé en position ventrale. La luminescence de cet organe le protège des prédateurs qui le confondent alors avec les reflets de la lune (Pennisi, 1996). Elle est due à la présence de la bactérie *V. fischeri* qui colonise l'organe peu après la naissance du calmar. La relation entre le calmar et *V. fischeri* est très spécifique, puisque seule cette espèce peut pénétrer et coloniser l'organe lumineux (McFall-Ngai, 2000). Bien que *V. fischeri* ne constitue qu'une faible part de la flore bactérienne de l'eau de mer, la colonisation se fait en quelques heures, laissant supposer un phénomène de reconnaissance entre l'hôte et son symbiote (Nyholm et al., 2000). La structure et la forme des cellules de l'organe lumineux et des bactéries symbiotiques sont modifiées après la colonisation (Foster & McFall-Ngai, 1998 ; Visick et al., 2000). La luminescence est due à la luciférase (Meighen, 1993), enzyme dont la production est induite suite à un phénomène d'action concertée ou "quorum sensing" des bactéries (Boettcher & Ruby, 1995).

Les ormeaux sont des mollusques gastéropodes qui se nourrissent d'algues fixées sur des substrats. L'ormeau japonais, *Haliotis discus hannai*, se nourrit principalement d'algues brunes riches en alginate. Sawabe et al. (1995) ont décrit la flore bactérienne de son tractus digestif comme majoritairement composée de *Vibrio halioticoli*. Ces auteurs ont observé la présence de *V. halioticoli* en larges quantités (40-60 % de la flore hétérotrophe cultivable) dans les tractus digestifs de plusieurs espèces d'ormeaux. Chez les ormeaux ne se nourrissant pas d'algues brunes, aucun *V. halioticoli* n'a été détecté. Les souches de *V. halioticoli* isolées des différentes espèces d'ormeaux sont capables de fermenter l'alginate en produisant de l'acide acétique et de l'acide formique, suggérant un rôle important de ces bactéries dans la digestion des algues par l'ormeau. Cette interaction est peut-être d'ordre symbiotique telles celles décrites entre les mammifères ruminants ou les termites et les bactéries présentes dans leur tube digestif pour la digestion des fibres végétales (Sawabe et al., 2003).

III.2 - Pathogènes

De nombreuses études font état de l'isolement de souches de *Vibrio* lors d'épisodes de mortalité de mollusques au stade larvaire, naissain ou adulte et sur des populations sauvages ou d'élevage. Leur implication en tant que pathogène a parfois été vérifiée par reproduction de la maladie en infection expérimentale, et les lésions et/ou mécanismes de virulence sont rarement décrits. En fait, ces bactéries sont souvent considérées comme des opportunistes se développant dans les conditions d'élevage intensif ou lors de conditions climatiques particulières. Des vibrioses sont décrites pour les trois principales classes de mollusques (Gastéropodes, Céphalopodes et Bivalves). Comme précédemment, une souche ou une espèce peut être pathogène pour plusieurs espèces de mollusques et une espèce de mollusques peut être infectée par plusieurs espèces de *Vibrio*.

III.2.1 - Gastéropodes

Plusieurs espèces de *Vibrio* ont été isolées lors d'épisodes de mortalités d'ormeaux en Australie, Japon, France, Chine, Afrique du Sud (Bower & McGladdery, 2003).

A ce jour, une seule étude fait état d'infections expérimentales sur des larves et post-larves de l'ormeau rouge, *Haliotis rufescens*, avec une souche de *V. alginolyticus*, isolée de maquereau ayant induit une intoxication alimentaire chez l'homme (Anguiano-Beltran et al., 1998). Après infection, les larves ne nagent plus, sédimentent et subissent de fortes mortalités (95 % en 48 h). Les auteurs ont conclu que certaines conditions environnementales et particulièrement les conditions stressantes présentes en élevage intensif pouvaient influencer l'issue des interactions entre souches de *Vibrio* pathogènes et animaux d'élevage.

Plusieurs épisodes de mortalité d'ormeaux post-métamorphose ont été associés à des souches de *Vibrio*, avec différents symptômes : pustules blanches (Li et al., 1998 ; Nicolas et al., 2002), abcès ou ulcères sur le manteau (Lee et al., 2001 ; Liu et al., 2001), syndrome de blanchissement (Liu et al., 2000 ; Huang et al., 2001)...

Elston et Lockwood (1983) ont décrit pour la première fois les lésions associées à des mortalités chez l'ormeau, *Haliotis rufescens* (perte de coloration et de tonicité des muscles, tentacules et bouche). L'hémolymphe et les organes des animaux malades sont colonisés par une grande quantité de bactéries d'un même type. Les tissus apparaissent dégénérés, nécrosés et colonisés par les bactéries qui semblent se développer en suivant le trajet du système nerveux. Les tissus sont parfois intensément infiltrés par des hémocytes contenant des

vacuoles mais pas de bactérie. La souche dominante chez les animaux malades et phénotypiquement proche de *V. alginolyticus* a également été isolée de l'eau et des parois des bacs d'élevage. Les auteurs ont suggéré que la maladie aurait pu être initiée par un phénomène d'hypoxie.

Le syndrome de blanchissement des ormeaux (décoloration des organes, diminution de l'activité) a d'abord été décrit aux Etats-Unis, associé à la température, à la disponibilité en aliments, et à la présence de bactéries (proches de *Rickettsia*) et de parasites (Moore et al., 2001). Des symptômes similaires, associés à la présence de souches de *V. parahaemolyticus* ont été décrits par Liu et al. (2000) et Huang et al. (2001) sur des ormeaux cultivés. Les symptômes ont été reproduits dans les deux cas en infection expérimentale avec les bactéries ou leurs surnageants de culture. Comme dans le cas du même symptôme aux Etats-Unis, la température semble être le facteur déclenchant des mortalités.

Une souche de *V. alginolyticus* et une de *V. parahaemolyticus* ont été isolées lors d'un épisode de mortalité de petits ormeaux, *Haliotis diversicolor supertexta*, en élevage (Lee et al., 2001 ; Liu et al., 2001). Les symptômes (abcès ou ulcères sur le manteau et perte de poids importante) ont été reproduits en infection expérimentale par injection de bactéries ou de surnageants de culture. Ces bactéries induisent de plus fortes mortalités à haute température.

Des pustules blanches ont été décrites dans deux épizooties distinctes. La première s'est produite en Chine, dans plusieurs structures d'élevage d'ormeaux *Haliotis discus hannai* à partir de 1993, avec des taux de mortalité de 50-60 % (Li et al., 1998). Différentes souches de *V. fluvialis* II ont été isolées et la maladie et les symptômes ont été reproduits en infection expérimentale par injection dans le muscle du pied, par des blessures sur le pied suivies d'une baignade dans une suspension bactérienne. La deuxième a concerné des populations sauvages et d'élevage le long de la côte atlantique française avec des taux de mortalité de plus de 50 % uniquement pour des températures supérieures à 17-18 °C (Nicolas et al., 2002). Une bactérie majoritaire a été isolée des animaux sauvages malades et identifiée comme appartenant à l'espèce *V. carchariae*. Les mortalités ont été reproduites après ingestion de broyat d'animaux infectés, après injection de suspension bactérienne dans le muscle du pied, après baignade dans une suspension bactérienne et après contact avec de l'eau où des animaux infectés avaient séjourné.

Ainsi, chez les ormeaux, des souches bactériennes appartenant à la même espèce peuvent entraîner des symptômes équivalents mais avec des taux de mortalités très différents (Nishimori et al., 1998 ; Nicolas et al., 2002) ; et des souches appartenant à des espèces différentes peuvent entraîner le même syndrome (Li et al., 1998 ; Nicolas et al., 2002).

III.2.2 - Céphalopodes

Deux études récentes ont décrit des vibrioses chez les Céphalopodes. La première concernait des populations de seiches, *Sepia officinalis*, *Sepia apama*, *Sepia pharaonis* maintenues en laboratoire (Sangster & Smolowitz, 2003). Une souche de *V. alginolyticus* a été isolée de trente-trois individus sur cinquante-trois analysés. Les organes atteints sont le rein, le cœur branchial et son appendice, les branchies, les organes reproducteurs et l'épiderme ; des infiltrations et de nombreuses bactéries Gram négatif sont associées aux lésions. La présence de *V. alginolyticus* a été considérée comme une infection secondaire survenant après une ulcération probablement due aux conditions de laboratoire.

La deuxième étude a concerné des populations de pieuvres sauvages, *Octopus vulgaris*, présentant des ulcères de la peau, des blessures profondes sur le manteau des bras et de la tête (Farto et al., 2003). Quand des animaux présentant ces lésions sont maintenus en captivité, leur état s'aggrave, allant parfois jusqu'à la mort. La flore bactérienne de l'hémolymphe et celle associée aux lésions étaient très variées (*Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*), mais seule une souche de *V. lentus* a permis de reproduire les lésions et la colonisation des organes internes en infection expérimentale par balnéation.

III.2.3 - Bivalves

Les épisodes de mortalité décrits dans la littérature concernent de façon très majoritaire les espèces cultivées, principalement au stade larvaire, que ce soit en structure fermée (écloserie, nurserie) ou en milieu ouvert. Cela peut être dû soit au fait que l'élevage intensif favorise l'apparition et le développement de maladies infectieuses, soit au fait que l'état de santé des populations sauvages n'est pas fréquemment évalué.

III.2.3.1 - Larves

La première description de bactéries impliquées dans des mortalités de larves de bivalves date de 1959 et faisait suite à un épisode de mortalité de larves de clam, *Venus mercenaria* (Guillard, 1959). Les épisodes de mortalité larvaire étaient caractérisés par la présence de bactéries proliférant autour des larves moribondes. L'utilisation d'antibiotiques entraînait une diminution des mortalités. L'exposition de larves saines à la flore de larves moribondes a entraîné un taux de mortalité de 90 %. Parmi cette flore, 2 souches, un *Vibrio* sp. et un *Pseudomonas* sp., ont induit des taux de mortalité supérieurs à 75 %. Les larves mises en

contact avec les surnageants de cultures ou des suspensions de bactéries mortes de ces deux souches n'ont subi aucune mortalité, mais elles ne s'alimentaient plus et un arrêt de croissance était observé.

Des épisodes de mortalité se sont produits dans des écloséries de plusieurs espèces de bivalves au cours des années 1960. Ils se caractérisaient également par la présence de bactéries proliférant autour des larves mortes et moribondes (Tubiash et al., 1965). Des infections expérimentales par des souches isolées de larves moribondes ont permis d'isoler cinq souches pathogènes responsables de la maladie nommée nécrose bacillaire (bacillary necrosis). Les signes de cette maladie sont une diminution de la mobilité des larves et une tendance à sédimenter, avec leur pied ou vélum étendu. Vingt-quatre heures après exposition à l'agent pathogène, la colonisation des tissus par les bactéries est massive et les tissus sont détruits. Une des souches isolées a été identifiée comme appartenant à *V. alginolyticus*, trois autres, phénotypiquement proches de *V. anguillarum*, ont été placées dans cette espèce, et la dernière souche n'a pu être identifiée qu'au niveau du genre, il s'agit aussi d'un *Vibrio*. Lors d'une étude taxonomique, Hada et al. (1984) ont identifié les 3 souches précédemment rattachées à *V. anguillarum* comme appartenant en fait à une nouvelle espèce, *Vibrio tubiashii*. De nombreux épisodes de mortalité de larves de mollusques ont été décrits comme nécrose bacillaire en se basant sur les descriptions de Tubiash et al. (1965) et Elston & Leibovitz (1980). Cependant, des souches appartenant à d'autres espèces de *Vibrio* ont été identifiées comme agent étiologique : une souche proche de *V. anguillarum* chez *C. virginica* aux Etats-Unis (Brown & Losee, 1978); trois souches proches de *V. splendidus*, *V. anguillarum*, *Vibrio nereis* et des souches de Tubiash et al. (1970) chez *C. gigas* et *O. edulis* (Jeffries, 1982); *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *V. alginolyticus*, *V. tubiashii*, *V. anguillarum*, *Vibrio* sp. chez *O. edulis* en Espagne (Lodeiros et al., 1987) et *V. splendidus* biovar II chez *C. gigas* au Japon (Sugumar et al., 1998).

Elston et Leibovitz (1980) ont décrit la pathogénèse associée à des inductions expérimentales de vibrioses sur des larves de *C. virginica*. Les deux souches de *Vibrio* utilisées avaient été isolées lors d'épisodes de mortalité en éclosérie. Les larves ont été mises en contact avec différentes concentrations de *Vibrio* (5.10^3 à 10^7 UFC.mL⁻¹). Des cultures fraîches de bactéries ont été inoculées à chaque renouvellement d'eau dans les bacs d'élevage de façon à reproduire le phénomène observé en éclosérie, structures dans lesquelles les animaux sont au contact permanent d'importantes concentrations de bactéries (Tubiash, 1974). Des prélèvements ont été effectués tous les jours pour observation macroscopique (mortalité,

morbidité, taille, anomalies) et microscopique (histologie, marquage des bactéries par des anticorps fluorescents). Trois types de pathogénèse ont été observés en fonction de l'âge/taille des larves et de la souche inoculée.

Le premier type de pathogénèse a été observé avec la souche 1031 sur des larves au stade produssoconche II avancé (quelques jours avant la fixation). Les bactéries envahissent l'animal de façon progressive à partir du bord de la coquille, le long du manteau et dans la cavité viscérale. Le lendemain de la première inoculation, plus de 95% des larves sont inactives, ne s'alimentent plus et présentent des anomalies du vélum. En histologie, les bactéries apparaissent attachées au periostracum externe et se développent le long de la face interne de la coquille, entraînant une rupture progressive du manteau et du vélum. De nombreuses cellules sont en dégénérescence avec des mitochondries altérées et des noyaux pycnotiques. A un stade avancé, suite à la prolifération des bactéries, tous les tissus sont détruits et les valves ne contiennent plus que des bactéries.

Le deuxième type de pathogénèse a été observé avec la souche 981 sur des larves aux stades produssoconche I et produssoconche II précoce (soit quelques jours après la fécondation). Les larves présentent d'importantes déformations du vélum avec à terme un détachement de morceaux de celui-ci. Les larves ont alors une capacité de mouvement réduite, une vitesse de nage anormale avec des mouvements erratiques, et sont incapables de rétracter leur vélum. En histologie, des dégradations importantes de celui-ci sont observées. A un stade avancé uniquement, des bactéries sont observées à l'intérieur de cellules détachées, dans la cavité du vélum et dans les tissus intacts. Quelques larves ayant un vélum fonctionnel mais anormal présentent des organes digestifs totalement nécrosés et une prolifération intense de bactéries dans la cavité viscérale.

Le troisième type de pathogénèse a été observé avec la souche 981 sur des larves au stade produssoconche II avancé (quelques jours avant la fixation). Les larves deviennent inactives, puis les viscères s'atrophient progressivement, les mouvements ciliaires sont ralentis, et, à un stade avancé de la maladie, les bactéries se développent, dans les tissus de la glande digestive, regroupées en foyers. Les animaux présentent une activité et une alimentation réduites. Le vélum est diminué suite à une atrophie et à une perte de ciliature des cellules. Les lésions de la glande digestive apparaissent comme plus précoces et plus importantes que celles du vélum, contrairement au deuxième type de pathogénèse. Des nécroses localisées sont parfois observées dans la glande digestive, associées à des foyers bactériens. Ce travail sert encore aujourd'hui de référence lors de description de maladies chez les larves de bivalves.

La littérature contient de nombreuses descriptions d'épisodes de mortalité ou d'infections expérimentales par des souches de *Vibrio* chez les larves de bivalves (huîtres, coquilles, palourdes...). Les espèces, hôte et pathogène, ainsi que les lésions sont regroupées dans le tableau 3. Peu d'études contiennent des descriptions détaillées de la pathogénèse et dans la majorité des cas, les lésions peuvent être rapprochées de celles observées par Elston & Leibovitz (1980), avec comme principaux symptômes une sédimentation des larves, des anomalies du vélum et/ou de la glande digestive.

Tableau 3. Espèces de *Vibrio* pathogènes de larves de bivalves marins

Référence	Hôte	Agent pathogène	Reproduction expérimentale des mortalités	Lésions
(Tubiash et al., 1965)	<i>Crassostrea virginica</i> <i>Mercenaria mercenaria</i>	<i>Aeromonas</i> sp., <i>Vibrio</i> sp.	Balnéation	Nécrose bacillaire, présence de bactéries dans et autour des moribondes, réduction de nage, pied et vélum étirés
(Brown & Losee, 1978)	<i>C. virginica</i>	Souche proche de <i>V. anguillarum</i>	Balnéation Surnageant de culture	Nécrose bacillaire, présence de bactérie autour de la coquille, vélum déformé et parfois détaché
(DiSalvo et al., 1978)	<i>Crassostrea gigas</i> <i>Ostrea edulis</i>	<i>V. anguillarum</i>	Balnéation Surnageant de culture	Sédimentation des larves, bactéries proliférant autour des moribondes
(Elston et al., 1981)	<i>C. virginica</i>	<i>Vibrio</i> sp.	Non	Perte de cellules du vélum, invasion bactérienne, forte nécrose, perturbation du cycle nutritif et altération du tractus digestif
(Brown, 1981)	<i>C. virginica</i>	2 souches de <i>V. anguillarum</i>	Balnéation	Présence de "globules" dans les tissus d'individus apparemment sains, diminution de croissance
(Jeffries, 1982)	<i>C. gigas</i> <i>O. edulis</i>	3 souches proches de Tubiash (1970) et de <i>V. nereis</i> , <i>V. splendidus</i> et <i>V. anguillarum</i>	Balnéation	Présence de bouts de ciliature détachés, vélum anormal, nage réduite, sédimentation des larves, présence de bactéries au bord de la coquille, nécrose
(Garland et al., 1983)	<i>C. gigas</i>	5 souches de <i>Vibrio</i> sp.	Balnéation	Perte de mobilité, anomalies de structure et fonction du vélum et des organes internes, forte nécrose
(Nottage & Birkbeck, 1987)	<i>O. edulis</i>	<i>V. alginolyticus</i>	Protéinase purifiée	
(Lodeiros et al., 1987)	<i>O. edulis</i>	<i>V. tubiashii</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. anguillarum</i> , <i>Vibrio</i> sp	Balnéation Surnageant de culture	Nécrose bacillaire, pathogénèse de type I

Tableau 3.(suite) Espèces de *Vibrio* pathogènes de larves de bivalves marins

Référence	Hôte	Agent pathogène	Reproduction expérimentale des mortalités	Lésions
(Brown & Tettelbach, 1988)	<i>M. mercenaria</i> <i>C. virginica</i>	<i>Vibrio</i> sp.	Balnéation Surnageant de culture	Diminution d'alimentation, nage en cercle, présence de "globules huileux" dans les tissus
(Nicolas et al., 1992a)	<i>Ruditapes philippinarum</i>	<i>Vibrio</i> sp.	Balnéation	Invasion bactérienne et lésions du tube digestif
(Sutton & Garrick, 1993)	<i>Tridacna gigas</i>	<i>V. splendidus</i> I, <i>V. orientalis</i> , <i>V. campbellii</i> , <i>V. metschnikovii</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. harveyi</i> , <i>V. damsela</i>	Balnéation	Inactivité, présence d'une masse amorphe entourant les larves et contenant des bactéries, destruction totale des tissus
(Riquelme et al., 1995)	<i>Argopecten purpuratus</i>	<i>V. anguillarum</i> -related	Balnéation Surnageant de culture	
(Riquelme et al., 1996)	<i>Argopecten purpuratus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	Balnéation	Sédimentation des larves,
(Nicolas et al., 1996)	<i>Pecten maximus</i>	<i>Vibrio</i> sp., <i>V. splendidus</i>	Balnéation	Lésions du vélum, nécrose, détachement de cellules, sédimentation des larves
(Anguiano-Beltran et al., 1998)	<i>Haliotis rufescens</i>	<i>V. alginolyticus</i>	Balnéation	Nage réduite, sédimentation des larves
(Sugumar et al., 1998)	<i>C. gigas</i>	5 souches de <i>V. splendidus</i> II	Balnéation	Perte de ciliature et de vélum, présence de bactéries autour de la coquille, "nécrose bacillaire"
(Luña-Gonzalez et al., 2002)	<i>Argopecten ventricosus</i> , <i>Nodipecten subnodosus</i> , <i>Atrina maura</i> , <i>C. gigas</i>	<i>V. alginolyticus</i>	Balnéation	Nage réduite, paralysie des cils, estomac vide, nécrose, présence de bactéries autour du vélum

III.2.3.2 - Juvéniles et adultes

Lipovsky et Chew (1972) ont maintenu, dans des structures de laboratoire, à différentes températures (9, 14 et 21 °C), des huîtres sauvages, *C. gigas*. Seules les huîtres placées à 21 °C ont subi des mortalités (100 %) 8 jours après le début de l'expérimentation. Si, à 21 °C, la quantité d'alimentation était augmentée, les mortalités se produisaient plus rapidement. Si la température de l'eau variait entre 9 et 21 °C ou si les animaux étaient en post-ponte, les mortalités étaient plus faibles. Des analyses histologiques sur les moribondes ont montré une destruction générale des tissus, de nombreuses infiltrations (visibles macroscopiquement sous la forme de pustules vertes), la présence de nombreuses cellules brunes, la dégénérescence des

tubules digestifs et la présence de nombreuses bactéries dans les tissus. Les bactéries observées en histologie ont été apparentées aux "*Vibrio* mésophiles". Les auteurs ont conclu à un phénomène multifactoriel impliquant des facteurs environnementaux (température, quantités importantes de nutriments, faible renouvellement d'eau) provoquant un état de stress pour l'huître et favorisant la croissance bactérienne. Ils ont rapproché ces observations des phénomènes observés sur le terrain et nommés mortalités estivales. Cette étude a été poursuivie par des infections expérimentales (Grischkowsky & Liston, 1974). Le phénomène des mortalités estivales a alors été reproduit en laboratoire en soumettant des lots d'huîtres à une température de 20 °C, à de grandes quantités d'aliments et à la présence de *V. alginolyticus* ou *V. anguillarum*. Ils ont suggéré qu'une forte température pourrait être le facteur déclenchant les épisodes de mortalités estivales.

Elston et al. (1982) ont décrit pour la première fois une maladie survenue dans une structure d'élevage intensif de juvéniles d'huîtres, *C. virginica* et *O. edulis*. Les symptômes ont été comparés à ceux observés sur *Mercenaria mercenaria* (clam) dans une autre structure d'élevage géographiquement éloignée. Environ 50 % des animaux présentaient des anomalies de la coquille, avec de grandes zones du periostracum non calcifiées et souvent détachées du reste de la valve, un degré de calcification irrégulier sur toute la valve, une croissance parfois disproportionnée entre les deux valves. Les auteurs ont observé une corrélation directe entre le nombre de bactéries et ciliés observés et le nombre d'animaux moribonds et morts. Les larves élevées dans les mêmes structures présentaient également des anomalies avec des cellules du vélum détachées. L'analyse bactériologique d'huîtres issues de plusieurs épisodes de mortalité dans ces structures a montré la présence d'une ou de deux souches majoritaires à croissance rapide (25-1 et 25-2), proches de *V. alginolyticus*. Ces mêmes souches étaient majoritaires dans l'environnement des animaux : 25-2 était présente dans l'eau, les cultures d'algues et sur les parois des bacs d'élevage ; 25-1 était exclusivement isolée des films bactériens présents sur les parois des bacs d'élevage. Une souche majoritaire (26-1), apparentée au genre *Vibrio*, a été isolée des palourdes analysées et des parois des bacs d'élevage. Cette infection se traduit par des altérations de la conchyoline du ligament, la surface de celui-ci étant recouverte d'une forte densité de bactéries uniformes. A un stade plus avancé, le ligament peut être complètement érodé et envahi par les bactéries. L'infection empêche la croissance normale de la coquille et interfère probablement avec les fonctions du ligament et le dépôt de calcium car les bactéries produisent de nombreuses substances acides. Ces bactéries ne sont observées que dans le ligament et la coquille près de la charnière et

aucun tissu mou ne semble endommagé. En revanche, l'observation du tractus digestif montre la lumière digestive vide, indiquant un manque d'ingestion et d'assimilation de composés alimentaires. L'aspect des cellules absorbantes de la glande digestive suggère des problèmes d'assimilation métabolique. Les auteurs ont supposé que, lors de leur fixation, les huîtres entrent en contact avec les bactéries 25-1 et 26-1 vivant sur les parois. La maladie pourrait résulter de l'interaction entre les souches 25-1 et/ou 25-2 et/ou des facteurs environnementaux stressants. Cette maladie du ligament n'a cependant pas été reproduite en infection expérimentale.

La culture de la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*, s'est développée en Europe au début des années 1970. Au cours de l'été 1987, des mortalités massives ont affecté les élevages de palourdes dans le nord de la Bretagne. Ce phénomène est maintenant présent tout le long de la côte atlantique française, en Espagne et épisodiquement en Italie (Paillard et al., 1994). La maladie se manifeste par la remontée à la surface des individus moribonds. Ils présentent majoritairement un dépôt organique brun en forme d'anneau sur la face interne des coquilles, généralement situé entre la ligne palléale et le bord de la coquille, d'où le nom de maladie de l'anneau brun. La digestion est également affectée par cette infection, avec dégénérescence de la glande et des diverticules digestifs (Plana & Le Pennec, 1991). Les animaux malades sont significativement plus petits et légers que les animaux sains. Le dépôt brun contient de grands nombres de champignons et bactéries. Seules les bactéries permettent de reproduire la maladie en infection expérimentale. L'agent étiologique de la maladie de l'anneau brun a été décrit comme appartenant à une nouvelle espèce de *Vibrio*, *Vibrio tapetis* (Borrego et al., 1996a). Paillard et Maes (1995a ; 1995b) ont décrit la pathogénèse de cette maladie ainsi que la colonisation par les bactéries grâce à un marquage fluorescent. Peu après l'inoculation d'une suspension de la souche pathogène dans la cavité palléale, la bactérie colonise le bord du manteau et la couche interne de la coquille. Un mois après inoculation, le periostracum est érodé et envahi par des débris cellulaires et des bactéries. La présence des bactéries perturbe la calcification ce qui entraîne la formation du dépôt brunâtre. Au cours du temps, le dépôt s'épaissit, induit la rétraction du manteau ce qui diminue l'étanchéité de la fermeture des deux valves. Le liquide extrapalléal, situé entre la coquille et le manteau contient de nombreuses bactéries. Allam et al. (2000) ont observé des modifications des paramètres hématocytaires après inoculation de *V. tapetis*. Les concentrations hématocytaires et les activités lysosomiales augmentent significativement dans l'hémolymphe et dans le liquide extrapalléal des animaux inoculés. Suite à ces premiers résultats, de nombreuses études ont

évalué l'impact de *V. tapetis* sur les hémocytes de la palourde (Lopez-Cortes et al., 1999 ; Allam et al., 2001 ; Choquet et al., 2003). Ainsi, *V. tapetis* agit sur les hémocytes, sur les activités phagocytaires et enzymatiques et provoque l'arrondissement des hémocytes. Malgré les nombreux résultats descriptifs (histopathologie, interactions hémocytes-bactéries), peu de facteurs de virulence ont été identifiés. La seule étude sur ces derniers a permis de décrire des activités hémolytiques et cytotoxiques *in vitro* (Borrego et al., 1996b). A ce jour, la maladie de l'anneau brun est l'interaction *Vibrio*/mollusques la plus détaillée tant au niveau de la reproduction de la maladie en infection expérimentale que de la description de la pathogénèse et des interactions hémocytes-bactéries.

Une étude sur les bactéries impliquées dans les épisodes de mortalités estivales du naissain de *C. gigas* a été initiée en 1995 au Laboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER La Tremblade (Waechter, 2001). Les épisodes étaient caractérisés par une faiblesse du muscle adducteur et un dépôt de vase jaune verdâtre au fond de la valve inférieure des moribondes. Des analyses bactériologiques ont été effectuées sur la flore hétérotrophe issue de broyats de chair d'huîtres provenant de lots subissant des épisodes de mortalité. Lors d'un de ces épisodes, trois groupes de genres bactériens ont été isolés : *Vibrio*, *Agrobacterium* et *Cytophaga/Flavobacterium*. La virulence des souches a été testée par balnéation de naissain dans des suspensions bactériennes. La souche TNEMF6 induit de 26 à 80 % de mortalité. Des analyses phénotypiques et phylogénétique basée sur le gène de l'ARN 16S ont apparenté cette souche à *V. splendidus* (Waechter et al., 2002). Dans une étude plus récente (Le Roux et al., 2004), cette souche a finalement été assignée à l'espèce *V. chagasii*.

Lacoste et al. ont publié plusieurs études sur les phénomènes de mortalités estivales (Lacoste et al., 2001a ; Lacoste et al., 2001b). Ils ont effectué des prélèvements sur des échantillons de différents lots et ont mesuré le taux de noradrénaline (hormone de stress) de ces animaux après un stress mécanique (agitation pendant 1 min). Ils ont observé que les lots dont les représentants avaient les taux d'hormone les plus bas ont subi les plus forts taux de mortalité sur le terrain. Après étalement de dilutions de broyat de ces huîtres, une souche majoritaire a été isolée sur milieu TCBS. Elle a été identifiée, après analyses phénotypiques et phylogénétiques basée sur le gène de l'ARN 16S, comme appartenant à l'espèce *V. splendidus*. La pathogénicité de cette souche a été évaluée en infection expérimentale par injection dans le muscle adducteur. La mortalité induite dépendait de la température à laquelle l'infection expérimentale était réalisée (Lacoste et al., 2001a).

Les travaux décrivant des souches de *Vibrio* pathogènes de Bivalves sont regroupés dans le tableau 4.

Tableau 4. Espèces de *Vibrio* pathogènes de juvéniles et adultes de bivalves marins

Référence	Hôte	Agent pathogène	Reproduction expérimentale des mortalités	Lésions
(Grischkowsky & Liston, 1974)	<i>C. gigas</i>	<i>V. anguillarum</i> , <i>V. alginolyticus</i>	Balnéation	
(Tubiash, 1974)	<i>C. gigas</i>	<i>V. anguillarum</i>	Balnéation, injection dans la cavité palléale	
(Elston et al., 1982)	<i>C. virginica</i> , <i>O. edulis</i> , <i>M. mercenaria</i>	<i>V. alginolyticus</i>		Lésion de la coquille, calcification irrégulière, altération des fonctions digestives
(Paillard et al., 1994)	<i>R. philippinarum</i>	<i>V. tapetis</i>	Cohabitation, injection dans le muscle ou dans la cavité palléale	Dépôt organique brun entre la ligne palléale et le bord de la coquille sur la face interne de la coquille (anneau brun), altérations des fonctions digestives, infiltration, altérations des fonctions immunitaires
(Lambert et al., 1999)	<i>P. maximus</i>	<i>V. splendidus</i>	Injection dans la cavité palléale	Dégénérescence du muscle, inversion des sexes, dépôt brun sur la face interne de la coquille
(Lacoste et al., 2001a)	<i>C. gigas</i>	<i>V. splendidus</i>	Injection dans le muscle adducteur	
(Waechter et al., 2002)	<i>C. gigas</i>	<i>V. splendidus</i>	Balnéation	

- Objectifs -

Les bactéries du genre *Vibrio* représentent le groupe le plus fréquemment associé à des maladies infectieuses chez les animaux aquatiques d'importance économique. Des études antérieures ont montré que des souches de *Vibrio* peuvent participer au développement des épisodes de mortalités estivales de *C. gigas*. Ce genre constitue, par ailleurs, un groupe intéressant du point de vue de son large spectre d'hôtes et de la diversité des symptômes induits. Cependant, malgré les nombreuses descriptions de souches de *Vibrio* associées à des mortalités, peu de données scientifiques sont disponibles sur les voies d'entrée, les sites de colonisation, les mécanismes de virulence, les lésions induites ainsi que sur les mécanismes de défense mis en jeu chez les organismes d'intérêt aquacole.

Les seules observations et analyses réalisées lors d'épisodes de mortalité ne permettent pas de déterminer les facteurs étiologiques prépondérants. C'est pourquoi la mise au point d'une infection expérimentale représente une étape primordiale dans l'étude d'une maladie. La reproduction expérimentale participe à la description des lésions induites par l'agent infectieux et des symptômes caractéristiques pouvant permettre le développement d'outils diagnostiques. Elle permet également d'évaluer l'effet d'un paramètre donné (facteurs environnementaux ou intrinsèques à l'hôte) sur la réponse de l'hôte, l'apparition et/ou le développement de la maladie. L'acquisition de ces connaissances participe au développement de moyens de lutte, les pratiques culturales pouvant être adaptées en fonction des facteurs environnementaux inhibant le développement de la maladie (Grizel, 1997). Enfin, la capacité à reproduire une infection en conditions contrôlées facilite l'évaluation de méthodes prophylactiques telles que la sélection de familles résistantes (Naciri-Graven et al., 1998) ou l'utilisation de souches probiotiques (Gram et al., 1999).

Le but de ce travail a donc été de mettre au point, chez *Crassostrea gigas*, une infection expérimentale par des souches de *Vibrio*.

Ainsi, la première étape de ce travail a consisté à isoler des souches de *Vibrio* à partir d'huîtres issues de lots subissant des épisodes de mortalités estivales. Les souches ont été caractérisées d'un point de vue taxonomique par une approche polyphasique incluant des tests phénotypiques et une analyse phylogénétique. Leur virulence a été évaluée en infection expérimentale, des souches pathogènes ayant alors été sélectionnées.

Dans un deuxième temps, les symptômes de la maladie ont été étudiés, les lésions induites par ces souches ayant été décrites suite à différentes techniques d'infection expérimentale. Les interactions entre ces souches et les hémocytes, effecteurs cellulaires du système immunitaire de l'huître, ont été étudiées en cytométrie en flux.

La troisième partie a consisté en l'étude de l'issue des infections expérimentales en fonction de paramètres physiologiques et génétiques de *C. gigas*.

Enfin, dans un quatrième temps, des souches inhibitrices de la croissance des souches de *Vibrio* pathogènes ont été sélectionnées et leur activité a été évaluée *in vitro*.

- Matériel et méthodes -

I - Souches bactériennes

Les différents milieux de culture utilisés sont décrits dans l'Annexe 4.

Les souches bactériennes intégrées dans les études taxonomiques phénotypiques et génotypiques ainsi que dans le spectre d'activité sont regroupées dans le tableau 5.

Tableau 5. Liste des souches bactériennes utilisées.

Nom d'espèce	Origine	Nom d'espèce	Origine
<i>Bacillus cereus</i>	(*)	<i>Vibrio</i> sp.	S322 (°)
<i>Bacillus subtilis</i>	CIP 52.62	<i>Vibrio aestuarianus</i>	01/32 (°)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	HD9 (*)	<i>Vibrio alginolyticus</i>	LMG 4409
<i>Enterococcus faecalis</i>	CIP 103214	<i>Vibrio anguillarum</i>	ATCC 19264 ^T
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CIP 102506 ^T	<i>Vibrio campbellii</i>	CIP 7067
<i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i>	INA 45 (*)	<i>Vibrio chagasii</i>	LMG 21353 ^T
<i>Micrococcus luteus</i>	CIP A270 ^T	<i>Vibrio cholerae</i>	CIP 56.38
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	<i>Vibrio cyclotrophicus</i>	LMG 21359 ^T
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp <i>aureus</i>	CIP 53154	<i>Vibrio fluvialis</i>	CIP 103355 ^T
<i>Escherichia coli</i> MC4100	ATCC 35695	<i>Vibrio gazogenes</i>	ATCC 29988
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Invitrogen	<i>Vibrio harveyi</i>	CIP 105197
<i>Escherichia coli</i> entéropathogène O111	CIP 52168	<i>Vibrio hollisae</i>	CIP 101886
<i>Escherichia coli</i> entéropathogène O26	CIP 52172	<i>Vibrio kanaloae</i>	LMG 20539 ^T
<i>Escherichia coli</i> entéropathogène	(*)	<i>Vibrio lentus</i>	CIP 107166 ^T
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp <i>pneumoniae</i>	CIP 53153	<i>Vibrio mediterranei</i>	CIP 103203 ^T
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	<i>Vibrio natriegens</i>	LMG 10935 ^T
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(*)	<i>Vibrio nigripulchritudo</i>	CIP 103195 ^T
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	LMG 2850
<i>Salmonella enteritidis</i>	(*)	<i>Vibrio pelagius</i>	LMG 3897 ^T
<i>Salmonella typhimurium</i>	CIP 5858	<i>Vibrio pomeroyi</i>	LMG 20537 ^T
<i>Salmonella typhimurium</i>	(*)	<i>Vibrio splendidus</i>	LMG 2042 ^T
<i>Shigella sonnei</i>	CIP 5255	<i>Vibrio tapetis</i>	CECT4600 ^T
<i>Shigella flexneri</i>	CIP 5236	<i>Vibrio tasmaniensis</i>	LMG 20012 ^T

(*):collection du Laboratoire de Biotechnologies et de Chimie Bio-organique (Université de La Rochelle, France); (°):collection du Centre de ressources biologiques (Laboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER, La Tremblade, France) ; ATCC: American Type Culture Collection ; CECT : Colección Española de Cultivos Tipos ; CIP: Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France ; LMG: Laboratorium voor Mikrobiologie, Gent, Belgium

Une fois isolées, les souches sont conservées à -80°C en cryotubes dans du milieu Zobell liquide avec 10 % de glycérol en deux réplicats.

Les souches bactériennes sont phénotypiquement caractérisées avec les tests suivants : coloration de Gram, mobilité, oxydase, mode respiratoire (aérobie, anaérobie, aérobie-anaérobie facultatif), voie d'attaque des glucides (métabolisme oxydatif ou fermentatif),

croissance à différentes températures (4, 20, 35 et 40 °C), croissance à différentes salinités (0, 2, 4, 6, 8 et 10 % NaCl), galerie API 20E (BioMérieux).

Les milieux sont modifiés pour permettre la croissance des bactéries halophiles : soit ils sont supplémentés en NaCl (2 %) soit l'eau distillée est remplacée par de l'eau de mer artificielle (MacDonell et al., 1982). Les suspensions bactériennes sont effectuées dans de l'eau de mer artificielle. Les tests nécessitant une croissance bactérienne sont incubés 24 h à 20 °C.

Les résultats de ces tests servent à établir un dendrogramme. Ils sont codés 1 pour un résultat positif et 0 pour un négatif. Les souches sont regroupées en utilisant la méthode des coefficients correspondants simples et la méthode des groupes par paire non compensée (Sneath & Sokal, 1973). Les souches de référence suivantes sont intégrées à cette analyse : *Vibrio splendidus* (LMG 4042^T), *Vibrio lentus* (CIP 107166^T), *Vibrio chagasii* (TNEMF6), *Vibrio aestuarianus* (01/32), *Vibrio mediterranei* (CIP 103203^T), *Vibrio campbellii* (CIP 7067), *Vibrio alginolyticus* (LMG 4409), *Vibrio harveyi* (CIP 105197) *Vibrio pelagius* (LMG 3897^T), *Vibrio fluvialis* (CIP 103355^T), *Vibrio natriegens* (LMG 10935^T), *Vibrio anguillarum* (ATCC 19264^T).

II - Cohabitations

Des huîtres vivantes issues de lots subissant des mortalités estivales (lot M) sont mises en contact avec des huîtres n'ayant jamais subi de mortalité (lot S), le lot M étant séparé du lot S par une grille de 5 mm de maillage. Les huîtres des lots M proviennent soit de lots appartenant à des professionnels, soit de lots expérimentaux présents sur le terrain dans le cadre du programme MOREST. Ces animaux servent pour une part à des analyses histologiques (Réseau de Pathologie des Mollusques, REPAMO), pour une autre à la détection du virus de type herpès par PCR (REPAMO) et pour une troisième aux expérimentations de cohabitation. Les huîtres des lots S proviennent d'un lot multiparental produit à l'écloserie IFREMER de La Tremblade. Elles sont maintenues en structure expérimentale et exemptes de mortalité anormale jusqu'à leur utilisation pour les cohabitations. Pour chaque expérimentation, un aquarium contenant 30 huîtres S sert de témoin négatif.

Tous les aquariums contiennent 2,5 L d'eau de mer filtrée à 5 µm et sont maintenus en conditions statiques dans une salle thermorégulée à 20 °C, avec bullage et alimentation quotidienne (*Isochrysis galbana* clone Tahiti et *Chaetoceros calcitrans*). Un relevé des

mortalités est effectué tous les jours pour les lots M et S et l'eau est changée une fois par semaine. L'expérimentation est arrêtée après quinze à vingt jours.

Dès que des mortalités apparaissent dans le lot S de l'aquarium de cohabitation, les hémolymphes de 3 huîtres moribondes sont prélevées par ponction dans la cavité péricardique et mélangées. Les hémolymphes de 3 huîtres vivantes du lot témoin négatif sont également prélevées et mélangées.

Les échantillons d'hémolymphe sont étalés (purs et dilués au 1/10, 1/100, 1/1000) sur milieu Zobell, permettant d'isoler la flore hétérotrophe totale et sur TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Saccharose), milieu sélectif pour la flore *Vibrionaceae*. Les boîtes sont incubées à 20 °C. Après 24 h de culture, les géloses sont observées et trois colonies de chaque type macroscopique sont choisies arbitrairement et repiquées deux fois sur milieu Zobell afin d'obtenir une culture pure.

III - Infections expérimentales

III.1 - Préparation des suspensions bactériennes

Les souches bactériennes sont cultivées pendant 36 h dans du milieu Zobell liquide sous agitation. La concentration bactérienne est évaluée par mesure de la densité optique à 540 nm. Quatre millilitres de culture sont centrifugés 30 min à 2 000 g. Le culot est repris dans 5 mL d'eau de mer artificielle stérile, la concentration finale étant de l'ordre de 10^8 bactéries/mL⁻¹.

III.2 - Infections expérimentales sur palourdes

Les palourdes, *Ruditapes philippinarum*, proviennent d'une éclosérie-nurserie (17, France). Elles mesurent de 3 à 5 cm. Elles sont maintenues en structures expérimentales pendant une semaine avant l'infection afin d'être acclimatées en température. Celle-ci est progressivement augmentée à raison de 2 °C par jour jusqu'à atteindre 20 °C.

Trente palourdes sont inoculées par lot. Cent microlitres de suspension bactérienne (soit environ 10^7 bactéries de chaque souche) sont injectés dans le muscle adducteur en passant l'aiguille à travers une faiblesse du ligament située du côté opposé à la charnière (Figure 4a). Le témoin négatif est constitué d'un lot de 30 palourdes injectées avec 100 µL d'eau de mer artificielle stérile (appelé EDMAS). Après injection, les palourdes sont laissées à sec une nuit,

puis mises en aquarium en conditions statiques comme décrit précédemment. L'expérimentation est arrêtée au bout de quatre jours.

III.3 - Infections expérimentales sur huîtres

Les huîtres, *Crassostrea gigas*, proviennent d'un élevage ostréicole (Fouras, 17, France). Il s'agit de naissain de 18 mois issu de captage naturel et mesurant 2 à 5 cm. Ces animaux sont cultivés en mer dans la zone intertidale. Comme pour les palourdes, les huîtres sont acclimatées en température avant expérimentation.

III.3.1 - Injection dans le muscle adducteur

Le nombre d'individus par aquarium est de 30. Les huîtres sont préalablement placées dans une solution à 50 g.L⁻¹ de MgCl₂ (250 g de MgCl₂, 2 L d'eau de mer et 3 L d'eau douce), supplémentée en phytoplancton, pendant 3 à 4 h (Culloty & Mulcahy, 1992). Le chlorure de magnésium a pour effet de bloquer le muscle adducteur, valves ouvertes. Un volume de 50 µL (soit environ 10⁷ bactéries de chaque souche) est alors injecté dans le muscle adducteur (Figure 4b). Un lot témoin de 30 huîtres est injecté avec de l'eau de mer artificielle stérile (EDMAS). Après injection, les huîtres sont immédiatement mises en aquarium en conditions statiques comme décrit précédemment. L'expérimentation est arrêtée au bout de trois jours.

III.3.2 - Injection dans la cavité palléale

Les huîtres sont au préalable meulées de façon à faire un trou au niveau de la jonction entre les 2 valves côté ventral (côté opposé au muscle adducteur, figure 4c). Par cet orifice, un volume de 50 µL de suspension bactérienne (soit environ 10⁷ bactéries) est injecté dans la cavité palléale sans endommager les tissus. Après injection, les huîtres sont conservées à sec pour la nuit puis maintenues en conditions statiques comme décrit précédemment. L'eau est changée une fois par semaine. L'expérimentation est arrêtée au bout de vingt et un jours.



Figure 4. Infections expérimentales : a) injection dans le muscle adducteur de palourde ; b) injection dans le muscle adducteur d'huître ; c) injection dans la cavité palléale d'huître

III.3.3 - Balnéation

Le naissain utilisé provient de l'écloserie de l'IFREMER La Tremblade, il est âgé d'environ 2 mois et mesure de 3 à 7 mm. Cent animaux sont placés dans chaque aquarium, avec bullage, dans 400 mL d'eau de mer filtrée à 5 μm et à une concentration finale de 10^7 bactéries.mL⁻¹. Les souches sont testées dans trois aquariums chacune. Trois aquariums ne contenant que de l'eau de mer constituent les témoins négatifs.

Après 8 h de contact, environ 2 L d'eau de mer sont ajoutés à chaque aquarium. Les animaux sont maintenus en conditions statiques comme décrit précédemment. Une partie de l'eau (1,5 sur 2,5 L) est renouvelée toutes les semaines. L'expérimentation est arrêtée au bout de trente jours.

IV - Biologie moléculaire

IV.1 - Extraction d'ADN

Plusieurs colonies bactériennes sont prélevées de cultures de 24 h sur milieu Zobell solide et incubées 10 h à 55 °C dans 500 µL de solution de lyse (NaCl 100 mM, Tris pH 8 10 mM, EDTA pH 8 25 mM, SDS 0.5 %, protéinase K 0.2 mg.mL⁻¹). Cinq cents microlitres de phénol à pH 8 et 500 µL de chloroforme-alcool isoamylique (24 : 1) sont ensuite ajoutés. L'ensemble est vortexé pendant 1 min puis centrifugé pendant 10 min à 9 300 g. La phase aqueuse (phase supérieure) est prélevée et 40 µL d'acétate de sodium 3 M pH 5,4 et 1 000 µL d'éthanol absolu y sont ajoutés. Le mélange est centrifugé pendant 10 min à 9 300 g. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 1 000 µL d'éthanol 70°. L'ensemble est centrifugé pendant 5 min à 9 000 g. Le surnageant est éliminé. Le culot est séché puis repris dans 100 µL d'eau avec de la RNase (0,1 mg.µL⁻¹). L'ensemble est incubé pendant 30 min à 37 °C. La concentration d'ADN est mesurée par densité optique à 260 nm puis ajustée par dilution à environ 500 ng.µL⁻¹.

IV.2 - Amplification en chaîne par la polymérase (PCR)

Le mélange réactionnel des réactions de PCR est le suivant : tampon de l'enzyme 10X, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM d'un mélange de désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 µM de chaque oligonucléotide, 2,5 U de Goldstar DNA Polymerase (Eurogentec) et environ 500 ng d'ADN, avec un volume final de 50 µL. Après une étape de dénaturation de l'ADN à 94 °C pendant 3 min, se succèdent 35 cycles composés d'une étape de dénaturation de 1 min à 94 °C, d'une étape d'hybridation de 1 min à 50 °C (16S) ou 58 °C (*gyrB*), d'une étape d'élongation de 1 min à 72 °C. L'étape finale est une étape d'élongation de 10 min à 72 °C.

Les amorces utilisées sont :

- pour le gène 16S : AS dir (AGA GTT TGA TCA TGG CTC AGA) et S17 rev (GTT ACC TTG TTA CGA CTT) correspondant respectivement aux positions 8-28 et 1493-1509 de la séquence 16S d'*Escherichia coli* (Lambert et al., 1998) ;
- pour le gène *gyrB* : UP-1E (CAG GAA ACA GCT ATG ACC AYG SNG GNG GNA ART TYR A) et APrU (TGT AAA ACG ACG GCC AGT GCN GGR TCY TTY TCY TGR CA) (Yamamoto & Harayama, 1995).

Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % en TAE 1X (préparé en 50X : 40 mM de Tris base, 40 mM d'acide acétique, 1 mM de Na₂EDTA.2H₂O qsp 1 litre d'eau distillée, pH 8). Du bromure d'éthidium (0,5 µg.mL⁻¹) est ajouté après avoir fait fondre puis refroidir l'agarose. Les échantillons sont mélangés à un tampon de dépôt (0,25 % de bleu de bromophénol, 0,25 % de xylène cyanol FF, 40 % de saccharose) à raison de 2 µL de tampon pour 10 µL d'échantillon. Après dépôt des échantillons, la migration est effectuée à 110 Volts pendant 30-50 min.

IV.3 - Purification des produits de PCR

Les produits de PCR sont purifiés en utilisant le Qiaex II Gel extraction kit (Qiagen). Après migration en gel d'électrophorèse, les bandes des produits de PCR sont découpées sous lumière ultraviolette. Elles sont incubées 10 min à 50 °C avec 10 µL de billes Qiaex II dans 500 µL de tampon QX1. L'ensemble est centrifugé 1 min à 9 300 g et le surnageant est éliminé. Le culot est repris dans 500 µL de tampon QX1. Après avoir été vortexé, l'ensemble est centrifugé 1 min à 9 300 g. Le surnageant est éliminé. Le culot est repris dans 500 µL de tampon PE (complété au préalable par 80 mL d'éthanol 95°), vortexé et centrifugé 1 min à 9 300 g. Cette opération est répétée deux fois. Le culot est séché à l'air puis repris dans 20 µL d'eau, vortexé, incubé 10 min à température ambiante, puis centrifugé 5 min à 9 300 g. Le surnageant est récupéré et stocké à -20°C.

IV.4 - Clonage

Le clonage des produits de PCR est effectué avec le vecteur pCRII et les bactéries compétentes TOP10 du TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen). Quatre microlitres de produit de PCR, 1 µL de solution saline, 1 µL de vecteur pCRII (25 ng.µL⁻¹) et 1 µL d'eau sont mélangés et incubés 30 min à température ambiante. Un tube de bactéries compétentes TOP10 et 2 µL de produit de ligation sont incubés 30 min sur glace puis 30 sec à 42 °C. Deux cent cinquante microlitres de milieu SOC sont ajoutés à ce mélange. L'ensemble est incubé 1 h à 37 °C sous agitation. Cent microlitres sont ensuite étalés sur une boîte de milieu LB (Annexe 4) avec ampicilline (50 mg.L⁻¹) et 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranoside (6,4 mg.L⁻¹). La boîte est incubée une nuit à 37 °C. Les colonies obtenues sont soit bleues (possédant un

plasmide sans insert) soit blanches (possédant un plasmide avec insert qui inactive le gène de la β -galactosidase).

L'ADN plasmidique des colonies blanches est extrait par lyse alcaline. Un tube de 3 mL de milieu LB avec ampicilline (50 mg.L^{-1}) estensemencé avec une colonie blanche et incubé une nuit à 37°C sous agitation. La culture est centrifugée (30 sec, 12 000 g) et le surnageant est éliminé. Le culot est repris dans 200 μL de solution I (glucose 50 mM ; Tris-HCl, pH 8, 25 mM ; EDTA 10 mM) avec RNase ($0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$) et incubé 5 min à température ambiante. Deux cents microlitres de solution II (NaOH 0,2 M, SDS 0,1 %) sont ajoutés et l'ensemble est mélangé délicatement par retournement. Le tube est incubé 5 minutes à température ambiante. Deux cents microlitres de solution III (CH_3COOK 5M 60 mL, acide glacial acétique 11,5 mL, eau distillée 28,5 mL) sont ajoutés et l'ensemble est mélangé doucement puis incubé 5 min sur glace. Le tube est centrifugé à 10 000 g pendant 5 min à température ambiante. La phase aqueuse (phase supérieure) est prélevée et ajoutée à 420 μL d'isopropanol. L'ensemble est vortexé, incubé 5 min à température ambiante, puis centrifugé 10 min à 10 000 g. Le culot est séché puis repris dans 30 μL d'eau.

IV.5 - Séquençage

Le kit Sequitherm Excell II (Epicentre) est utilisé pour la réaction de séquence. Le volume total utilisé pour la réaction est de 20 μL . Le mélange comprend le tampon de l'enzyme 3,5X, 1 μM de chaque oligonucléotide, 5 U d'Excell II DNA Polymerase et 10 μL de produit de PCR purifié ou de produit d'extraction plasmidique. Pour chaque produit de PCR, le mélange est réparti en 4 puits chacun recevant un didésoxynucléotide différent (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Chaque oligonucléotide est marqué par un fluorochrome différent (700 ou 800 nm). Le cycle comprend une étape de dénaturation de 2 min à 92°C , puis 30 cycles avec une étape de dénaturation de 30 sec à 92°C , une étape d'hybridation de 30 sec à 58°C et une étape d'élongation de 1 min à 70°C . A la fin de la réaction, 3 μL de solution Stop sont ajoutés à chaque puits. La migration se fait sur un séquenceur Li-cor DNA (ScienceTec).

IV.6 - Analyses phylogénétiques

Les séquences du gène *gyrB* et 16S des souches de *Vibrio* sont alignées et des analyses phylogénétiques sont réalisées à l'aide des programmes Seaview et Phylo_win (Galtier et al.,

1996). Les arbres phylogénétiques sont construits en utilisant la méthode BIONJ (Gascuel, 1997) appliquée aux distances à 2 paramètres de Kimura. La fiabilité de la topologie a été évaluée par la méthode des bootstraps avec 500 répliqués.

Les séquences du gène 16S de la souche de *Pseudoalteromonas* sont alignées en utilisant le programme ClustalW (Thompson et al., 2000) disponible sur le site de l'European Bioinformatics Institute (www.ebi.ac.uk). L'arbre phylogénétique est construit en utilisant le programme TREECON (Van de Peer & De Wachter, 1994). La fiabilité de la topologie a été évaluée par la méthode des bootstraps avec 1 000 répliqués.

V - Microscopie

V.1 - Microscopie photonique

V.1.1 - Fixation

Les coquilles des individus sont ouvertes en glissant une lame de couteau entre les deux valves au niveau de la charnière puis en la faisant progresser le long de l'animal, sans endommager les tissus, jusqu'au muscle adducteur pour le sectionner le plus près possible de la valve supérieure. Une fois l'huître ouverte, la chair est sortie de la coquille. Elle est placée dans du fixateur de Davidson (1 200 mL d'eau de mer, 1 200 mL d'éthanol 95°, 300 mL de formaldéhyde à 38%, 400 mL de glycérol, 310 mL d'acide acétique cristallisable, ce dernier étant ajouté extemporanément) pendant au moins 24h à température ambiante ou plusieurs jours à froid.

V.1.2 - Déshydratation, imprégnation et inclusion

La réalisation des blocs nécessite une série d'étapes : déshydratation par des bains successifs d'éthanol de concentration croissante, puis élimination de l'éthanol par des bains successifs de xylène et imprégnation des tissus par de la paraffine liquide à 60 °C. Ces étapes sont réalisées à l'aide d'un automate LKB. La dernière étape consiste à positionner le tissu dans un moule métallique et à le recouvrir de paraffine liquide puis à le refroidir sur une table réfrigérante. Les blocs peuvent ensuite être conservés à température ambiante.

V.1.3 - Coupes et coloration

Les blocs de paraffine contenant les tissus sont d'abord dégrossis en effectuant des coupes de 20 µm d'épaisseur avec un microtome LKB de façon à atteindre la zone d'intérêt. Ils sont ensuite refroidis ce qui permet de durcir la paraffine et donc de faciliter la coupe. Des coupes de 2 µm sont ensuite réalisées. Elles sont déposées à la surface d'un bain-marie à 37°C et récupérées sur des lames. Celles-ci sont conservées une nuit à 60 °C pour éliminer l'excès de paraffine et coller le tissu à la lame.

La coloration à l'hémalum-éosine est une coloration topographique. L'hématoxyline colore les structures nucléaires en bleu violet foncé et les cytoplasmes en gris et l'éosine colore les structures acidophiles en rose.

Les coupes sont déparaffinées par deux bains de 30 min dans du xylène. Elles sont réhydratées par un bain d'éthanol absolu de 15 min, un bain d'éthanol 95° de 15 min et un passage de 5 min dans de l'eau courante. Elles sont colorées à l'hémalum pendant 1 min 30, rincées pendant 5 min à l'eau courante puis contre colorées à l'éosine pendant 3 min 30. Enfin les lames sont déshydratées par deux bains de 1 min à l'éthanol 95°, un bain de 1 min à l'éthanol 100°. Deux bains de 1 min de xylène permettent d'éliminer les traces d'éthanol. Une colle (Eukitt), miscible au xylène mais non à l'eau, est déposée entre lame et lamelle, assurant une conservation durable des préparations.

Les observations sont effectuées sur un microscope optique Olympus BX50.

V.2 - Microscopie électronique à transmission

V.2.1 - Fixation

Les huîtres sont ouvertes comme décrit précédemment. La chair est conservée en fixateur de Carson (23,8 g de NaH₂PO₄.2H₂O ; 5,2 g de NaOH ; 100 mL de formaldéhyde à 40 % ; 900 mL d'eau distillée ; pH 7,2-7,4) à température ambiante. Des fragments de tissus (3-4 mm) correspondant à des zones d'intérêt sont rincés par 3 ou 4 bains de 24 h en tampon cacodylate (50 mL de cacodylate de sodium 0,4 M ; 20 mL de NaCl 10 % ; 30 mL d'eau distillée ; pH 7,4). Les échantillons sont ensuite fixés dans du glutaraldéhyde 3 % (2,5 mL de glutaraldéhyde 25 % ; 5 mL de cacodylate de sodium 0,4 M ; 3,5 mL de NaCl 10 % ; 9 mL d'eau distillée) pendant au moins 2 h à 4 °C. Ils sont rincés en tampon cacodylate 3 fois

10 min, post fixés par l'acide osmique 1 % (1 volume d'acide osmique 4 % ; 1 volume de cacodylate de sodium 0,4 M ; 1 volume de NaCl 10 % ; 1 volume d'eau distillée) pendant une heure à 4 °C et rincés en tampon cacodylate deux fois 10 min.

V.2.2 - Déshydratation, imprégnation et inclusion

Les tissus sont déshydratés progressivement par des bains successifs d'éthanol (éthanol 70° 1 fois 10 min, éthanol 95° 2 fois 15 min et éthanol absolu 3 fois 20 min) puis par deux bains de 15 min en oxyde de propylène. Les pièces sont progressivement imprégnées d'abord dans un mélange d'oxyde de propylène-Epon (50-50) pendant 1 h, puis dans de l'Epon seul (12,32 g d'Epon 812 ; 6,2 g de Dodecyl succinique anhydre ; 6,2 g de méthylbornène-2,3-dicarboxylique anhydre ; 0,3 g de 2,4,6-Tris(diméthyl-aminométhyl)phénol) pendant 1 h. L'inclusion est réalisée dans de petits moules remplis d'Epon. Les blocs sont placés pendant au moins 48 h à 60 °C pour solidification.

V.2.3 - Coupes et contraste

Les coupes sont réalisées avec un couteau de diamant, à l'aide d'un ultramicrotome LKB. Les coupes ultrafines (80-100 nm d'épaisseur) sont déposées sur des grilles de cuivre.

Les solutions utilisées pour les contrastes sont au préalable centrifugées 15 min à 12 000 g afin d'éliminer les précipités éventuels.

Les grilles sont déplacées de réactif en réactif à l'aide de pinces. La première étape consiste en un bain de 30 min à l'obscurité dans de l'acétate d'uranyle (1 volume d'acétate d'uranyle à 5 % et 1 volume d'éthanol 50 °). Les échantillons sont rincés dans de l'éthanol 25 ° puis dans de l'eau distillée et séchés pendant au moins 20 min. Le bain de 3 min dans le citrate de plomb (mélanger 16 mL d'eau distillée bouillie, 3 mL de citrate de sodium 1 M puis 2 mL de nitrate de plomb 1 M sous agitation douce, agiter après formation du précipité, ajouter 4 mL de NaOH 1 M, la solution doit être limpide) est effectué dans une atmosphère close contenant des pastilles de KOH pour l'assécher et limiter la précipitation du citrate de plomb. Les grilles sont rincées trois fois dans de l'eau distillée et séchées au moins 20 min.

Les observations sont effectuées sur un microscope électronique à transmission JEOL JEM 1200EX à 80 kVolts.

V.3 - Cytocentrifugation

Les hémocytes sont déposés sur lame de verre par centrifugation douce (30.5 g pendant 1 min). Les lames sont séchées et colorées à l'aide du kit Hemacolor (Merck) : 1 min dans un bain de fixation (méthanol), 1 min dans un bain du colorant A et 1 min dans un bain du colorant B. Les lames sont séchées puis montées (cf. V.1.3) après un bain de xylène. L'observation se fait sur un microscope optique Olympus BX50.

VI - Cytométrie en flux

Le cytomètre en flux utilisé lors de cette étude est un EPICS XL 4 (Beckman Coulter). Dans cette étude, un seuil minimum de la taille des particules est établi de façon à ce que les événements comptabilisés ne comprennent que des hémocytes et pas de bactéries. Le nombre d'événements analysés par condition et par paramètre est de 3 000.

VI.1 - Prélèvement

Les huîtres utilisées en biologie cellulaire proviennent d'un élevage ostréicole (La Tremblade, 17, France). Une brèche est pratiquée à l'aide d'une pince au niveau de la jonction des deux valves, proche de l'insertion du muscle adducteur. L'hémolymphe est prélevée dans le muscle adducteur et observée au microscope inversé. Si une trop grande densité de gamètes, débris ou bactéries est observée, l'échantillon est éliminé. Les hémolymphe d'une trentaine d'individus sont mélangées de façon à réduire la variabilité individuelle. Elles sont filtrées sur filtre à 60 µm et conservées sur glace avant utilisation. La concentration hémocytaire est évaluée par comptage sur cellule de Malassez.

VI.2 - Mise en contact hémocytes/bactéries

Les suspensions bactériennes sont préparées comme précédemment décrit. Le rapport entre hémocytes et bactéries est de l'ordre de 1 pour 50.

L'hémolymphe est divisée en cinq parties, chacune étant mise en contact avec une souche bactérienne différente : la souche 125 (*V. mediterranei*), la souche 31 (proche de *V. splendidus*), la souche 32 (proche de *Vibrio splendidus*) ou le couple de souches 31 et 32,

la dernière, mise en contact avec de l'EDMAS, constituant le témoin négatif. Ainsi, pour chaque expérimentation, il y a cinq conditions nommées : EDMAS, 125, 31, 32 et 31+32. Pour chaque condition, le volume du tube est alors réparti en 3 volumes égaux dans de nouveaux tubes, incubés pendant 5 à 6 h à 20 °C (Figure 5). Après incubation, une partie du tube est utilisée pour analyse en cytométrie en flux, et l'autre en cyto-centrifugation pour évaluer la quantité de cellules ayant phagocyté des bactéries.

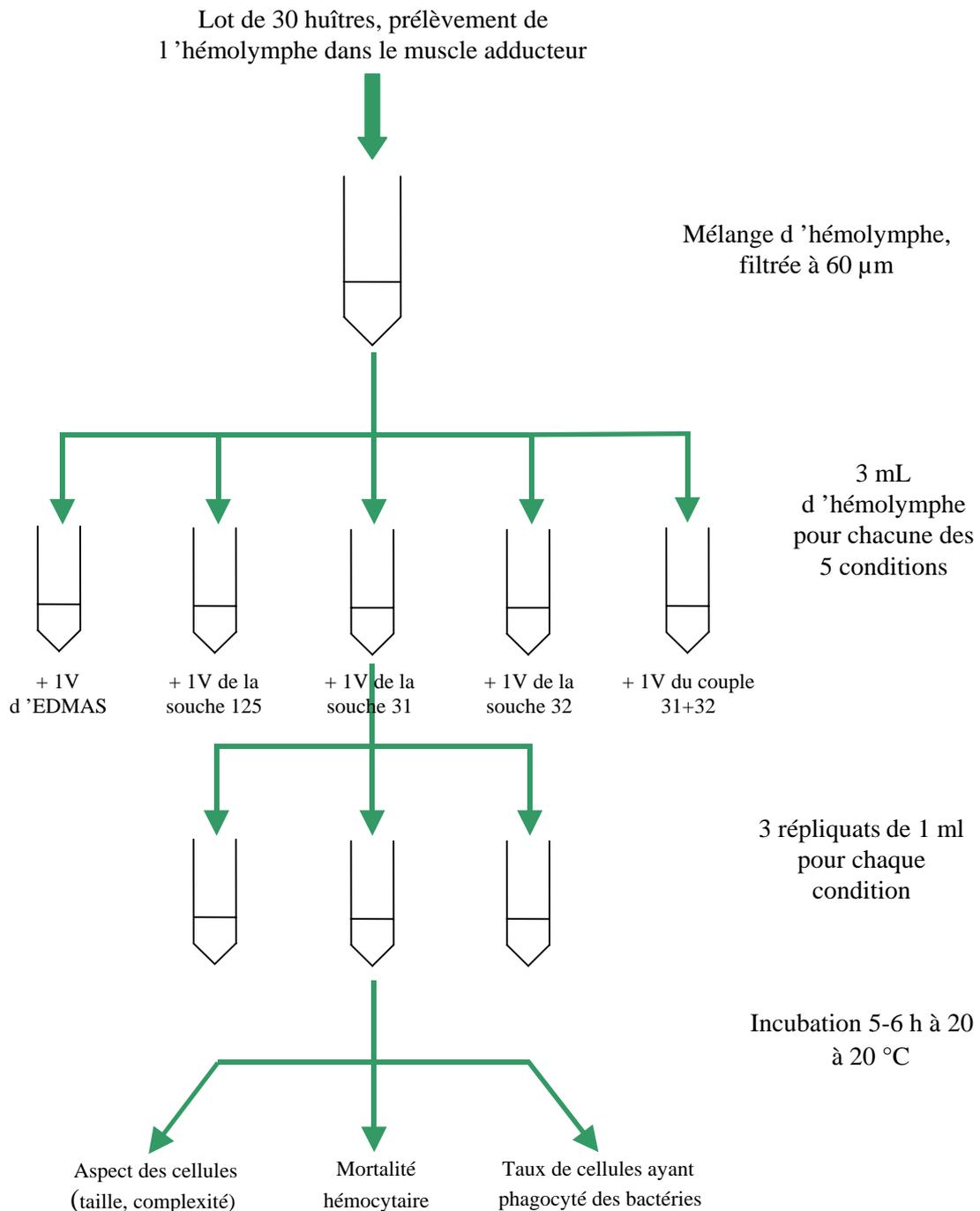


Figure 5. Protocole de l'étude sur les interactions bactéries/hémocytes

VI.3 - Analyse

VI.3.1 - Aspect des cellules

Chaque cellule émet deux signaux lumineux :

- une diffusion dans l'axe, recueillie en Forward Scatter Height (en abscisse sur les cytogrammes présentés), essentiellement due à la diffraction de la lumière par la surface membranaire, proportionnelle à la taille ;
- une diffusion aux grands angles, recueillie en Size Scatter Height (en ordonnée sur les cytogrammes présentés), provenant de la diffraction de la lumière par les organites intracellulaires, proportionnelle à la granularité ou complexité des cellules.

VI.3.2 - Mortalité hémostatique

Cinq microlitres d'iodure de propidium (1 mg.L^{-1}) sont mélangés à 200 μL du mélange hémocytes/bactéries. L'ensemble est incubé 30 min sur glace et à l'obscurité. L'iodure de propidium est un fluorochrome (signal rouge) qui pénètre dans les cellules dont la membrane est lésée et se fixe sur l'ADN et l'ARN. Ainsi, les cellules marquées correspondent aux cellules mortes.

VI.3.3 - Apoptose

Le protocole comprend l'utilisation de 2 fluorochromes : l'iodure de propidium décrit ci-dessus et marquant les cellules mortes et l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC, signal vert). Quand une cellule entre en phase précoce d'apoptose, les résidus phosphatidyl sérines, normalement exposés sur la face interne de la membrane cytoplasmique, ont leur polarité inversée et sont alors au contact du milieu extracellulaire. L'annexine V présente une forte affinité pour ces résidus. Dans le kit utilisé (Annexin V kit FITC, Beckman Coulter), l'annexine est couplée au FITC, marquant ainsi les cellules en phase précoce d'apoptose alors que l'iodure de propidium marque les cellules mortes. Ce double marquage permet de répartir les cellules en 4 groupes : les cellules non marquées, les cellules marquées au FITC (en phase précoce d'apoptose), les cellules doublement marquées (en phase de nécrose secondaire) et les cellules marquées à l'iodure de propidium (cellules mortes).

VII - Recherche de souches inhibitrices

VII.1 - Prélèvement, sélection des souches

Les huîtres proviennent d'un élevage ostréicole (Fouras, 17, France) et mesurent entre 5 et 7 cm. Leur hémolymphe est ponctionnée directement dans la cavité péricardique. Les hémolymphe de 5 individus sont mélangées. La population bactérienne est dénombrée sur gélose Zobell. Les échantillons sont dilués afin d'obtenir une centaine de bactéries par millilitre et filtrés sur membrane HGMP (hydrophobic grid membrane filtration, QA Life Science, Inc, système de filtration ISO-GRID). Cette technique consiste en une filtration sous vide au travers d'une membrane de polysulfone avec quadrillage hydrophobe (0,45 μm). Après filtration, la membrane est déposée sur une gélose Zobell et mise à incuber à 20 °C pendant 48 h. Après incubation, la membrane est retirée de la gélose et conservée à 4 °C. La gélose est inondée avec 3 mL d'une suspension de la souche sensible (à 10^6 - 10^7 UFC.mL⁻¹) en EDMAS ; 5 min après, le surplus de liquide est éliminé. Après incubation (24 h à 20 °C), des auréoles d'inhibition sont observées.

Les colonies correspondant aux zones d'inhibition sont prélevées et isolées. Leur activité inhibitrice est à nouveau testée en les déposant sur des membranes HGMP déposées sur une gélose Zobell. La gélose est incubée à 20 °C pendant 24 à 48 h. Les activités inhibitrices sont révélées par inondation comme décrit ci-dessus.

VII.2 - Production des substances inhibitrices en milieu liquide

Les souches sont cultivées dans 100 mL de M9GCNT (milieu minimum M9 supplémenté en glucose, casamino acids et thiamine) sous agitation orbitale (160 rpm) à 20 °C pendant 20 h. Le surnageant de culture est obtenu par centrifugation (30 min, 13 000 g, 4 °C).

L'activité inhibitrice du surnageant est testée par la méthode de diffusion en puits. Une gélose Zobell est inondée avec 3 mL d'une suspension de la souche sensible (10^6 - 10^7 UFC. mL⁻¹), après 5 min, l'excédent de liquide est éliminé. Des cylindres de verre stériles (diamètre intérieur 4 mm) sont déposés sur la gélose et remplis avec 20 μL de surnageant. Après incubation (24 h à 20 °C), l'activité inhibitrice est évaluée par le diamètre des zones d'inhibition.

VII.3 - Etude des substances produites par la souche inhibitrice

VII.3.1 - Stabilité vis-à-vis de la température et d'enzymes

L'effet de la température sur l'activité du surnageant de culture est évalué après un traitement de 10 min à 100 °C. L'effet d'enzymes sur l'activité du surnageant est évalué en incubant celui-ci avec de la protéinase K (0,2 mg.mL⁻¹, 20 mM Tris-HCl, pH 7,0) ou de l' α -amylase (0,2 mg.mL⁻¹, 30 mM Sodium Acetate, pH 6,0) 1 h à 37 °C. L'activité du surnageant après ces traitements est évaluée par la méthode de diffusion en puits.

VII.3.2 - Evaluation de la masse molaire

La taille de la molécule inhibitrice est évaluée grâce à l'utilisation de membranes de dialyse. Des membranes de dialyse de différentes limites d'exclusion (1, 6-8 et 12-14 kDa) sont placées sur une gélose Zobell. Une colonie de la souche inhibitrice y est déposée. Après incubation (24 h à 20 °C), les membranes sont retirées et les activités inhibitrices sont révélées par inondation comme décrit ci-dessus.

VII.3.3 - Spectre d'activité

La sensibilité d'une collection de souches Gram positif et négatif (Tableau 1 de l'article 3) est évaluée par la méthode des membranes HGMF. Pour les souches n'appartenant pas au genre *Vibrio*, la révélation est effectuée en coulant une gélose molleensemencée à 10⁷ UFC. mL⁻¹ de la souche cible par-dessus la première gélose et en incubant à la température optimale de croissance de la souche cible.

VII.3.4 - Influence du fer

L'influence du fer sur la production de la molécule inhibitrice est évaluée sur milieu Zobell, sur milieu Zobell supplémenté en fer (0,1 mM FeCl₃). L'activité inhibitrice est testée par la méthode des membranes HGMF. La révélation est effectuée par inondation comme décrit ci-dessus.

VII.4 - Production de sidérophores

La production de sidérophores est évaluée par la méthode du chrome azurol S (CAS) adaptée de Schwyn & Neilands (1987) et Milagres et al. (1999) sur milieu M9GCNT (Annexe 5). Chaque boîte de Pétri contient pour moitié du milieu "Blue Agar CAS" et pour moitié du milieu M9GCNT solide. La gélose M9GCNT estensemencée à l'aide d'une pipette Pasteur avec une colonie de la souche à tester, puis incubée (3-5 j en fonction des souches). L'observation d'une zone orange dans le milieu CAS correspond à la production d'un sidérophore.

VII.5 - Sélection de mutants non producteurs de substances inhibitrices

Le protocole de mutagenèse utilisé est celui de Lee et al. (2000) modifié. Cinq millilitres de milieu Zobell liquide sontensemencés à 1 % avec une culture de 20 h de la souche et incubés sous agitation à 20 °C pendant 7 h. Les bactéries sont centrifugées (4 000 g, 10 min), rincées deux fois avec de l'EDMAS et resuspendues dans 2 mL d'EDMAS. La mutagenèse est effectuée avec 50 µg.mL⁻¹ de N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) à 20 °C pendant 1 h. Les bactéries sont ensuite rincées deux fois en EDMAS, resuspendues dans 3 mL de milieu Zobell et incubées une nuit à 20 °C sous agitation orbitale (160 rpm). Des dilutions de cette culture sont étalées sur milieu Zobell et après 48 h d'incubation, l'activité inhibitrice des colonies est testée par la méthode des membranes HGMF. Les colonies ne produisant aucune activité inhibitrice sont isolées. Leur courbe de croissance est comparée à celle de la souche sauvage, afin de sélectionner celle s'en rapprochant le plus.

VII.6 - Cocultures

Les cocultures sont effectuées en erlenmeyer sous agitation orbitale à 20 °C et en milieu M9GCNT. Des pré-cultures des souches bactériennes sont réalisées en milieu M9GCNT liquide (20 h de culture, 20 °C, sous agitation orbitale). La souche inhibitrice estensemencée à 1 % dans un erlenmeyer. La croissance de la souche inhibitrice est évaluée par mesure de la densité optique. Dès que la phase exponentielle de croissance de la souche inhibitrice commence (environ 2 h), différentes concentrations (10⁴, 10⁶ ou 10⁷ UFC.mL⁻¹) de la souche sensible sont ajoutées à cette culture. Des prélèvements sont ensuite effectués toutes les

heures pendant quatre heures pour numérations sur gélose Zobell, permettant la croissance des 2 souches et sur milieu TCBS, milieu sélectif de la flore *Vibrionaceae*. Pour chaque expérimentation, le témoin consiste en une coculture avec la souche mutante non inhibitrice. Pour chaque concentration de la souche sensible, les expérimentations sont effectuées en triplicats.

VII.7 - Surnageant

Des surnageants de culture des souches inhibitrice et mutante sont traités par chauffage (10 min, 100 °C) puis refroidis à température ambiante. Les surnageants sontensemencés à 1 % avec une pré-culture de 20 h de la souche sensible et incubés à 20 °C. Des prélèvements sont effectués à 0, 3, 6 et 24 h après inoculation et la concentration de la souche sensible est évaluée par numération sur gélose Zobell.

Du surnageant de culture de la souche inhibitrice est prélevé à différents temps de culture (4, 6, 12, 18 et 24 h) etensemencé à 10^5 UFC.mL⁻¹ avec la souche sensible. La survie de celle-ci est évaluée par prélèvement à 0, 6, 12 et 24 h et étalement sur gélose Zobell.

-Résultats-

I - Etablissement et caractérisation de la collection de souches de *Vibrio*

La pathogénicité des deux souches proches de *Vibrio splendidus* (S8 et TNEMF6) isolées d'épisodes de mortalité anormale de *Crassostrea gigas* a été évaluée en infection expérimentale par Waechter et al. (2002) et Lacoste et al. (2001a). Cependant, les résultats induits par la souche S8 sont significativement influencés par un état de stress provoqué par une agitation mécanique ou par l'injection d'hormones impliquées dans la réponse au stress (Lacoste et al., 2001a ; Lacoste et al., 2001b), et les taux de mortalité induits par la souche TNEMF6 sont très variables (Le Roux et al., 2002 ; Waechter et al., 2002).

Dans cette première partie, nous avons isolé une collection de souches de *Vibrio* à partir d'huîtres issues de lots subissant des épisodes de mortalités estivales sur la côte atlantique française. Ce choix fait suite à une série d'observations et de résultats laissant suspecter une implication de souches de *Vibrio* dans ces mortalités anormales : isolements fréquents de souches de *Vibrio* chez les animaux subissant des mortalités, augmentation de la flore *Vibrionaceae* chez les animaux voisins d'animaux subissant des mortalités, implication de souches de *Vibrio* dans des épisodes de mortalités anormales de nombreuses espèces aquatiques (Grischkowsky & Liston, 1974 ; Tubiash, 1974 ; Le Roux et al., 2002 ; Waechter et al., 2002).

Par ailleurs, cette collection est également utilisée pour les études de taxonomie effectuées au laboratoire (Annexes 1 à 3) et est intégrée pour partie dans la collection de souches de *Vibrio* pathogènes d'organismes d'intérêt aquacole maintenues au Centre de Ressources Biologiques de La Tremblade (CRB-LGP).

I.1 - Constitution de la collection

Au cours de l'été 2001, des huîtres vivantes (lot M) issues de lots subissant des épisodes de mortalités estivales ont été prélevées le long de la côte atlantique française. Ces individus sont utilisés dans des expérimentations de cohabitation avec des lots d'huîtres saines dites

"sentinelles" (lot S). Dans neuf cohabitations sur douze, des taux de mortalité supérieurs à 50 % dans les lots S sont observés (Tableau 1 de l'Article 1). Un des neuf lots M (Fouras 01-116) s'est avéré être positif pour le virus de type herpès et n'est pas analysé en bactériologie. Les expérimentations Arcachon 01-88 et Perquis J1 représentent des prélèvements effectués au même moment et sur le même lieu géographique que Arcachon 01-90 et Perquis J8 et ne sont donc pas analysés. Des analyses bactériologiques ont été effectuées pour six des cohabitations.

Ainsi, la collection de souches de *Vibrio* constituée au cours de cette étude est composée de 82 souches isolées d'huîtres en cohabitation (souches 1 à 82) et de 43 souches isolées de témoins négatifs (souches 83 à 125).

I.2 - Caractérisation phénotypique

Trente et un caractères phénotypiques sont étudiés pour les 125 souches de la collection et l'analyse de ces résultats en taxonomie numérique permet de constituer un dendrogramme (Figure 6). Les 125 souches sont réparties en 7 groupes représentés par des triangles de couleur. La majorité des souches (77) sont regroupées avec les souches types de *V. splendidus* et *Vibrio lentus* (83 % de similitude). Le deuxième groupe (88 %) comprend 9 souches et la souche type de *Vibrio aestuarianus*. Le troisième groupe (81 %) comprend 8 souches et la souche type de *Vibrio anguillarum*. Le quatrième groupe (85 %) comprend 17 souches. Le cinquième groupe (89 %) comprend 5 souches et la souche type de *Vibrio mediterranei*. Le sixième groupe (78 %) comprend 2 souches et une souche de *Vibrio chagasii*. Le septième groupe (85 %) comprend 7 souches.

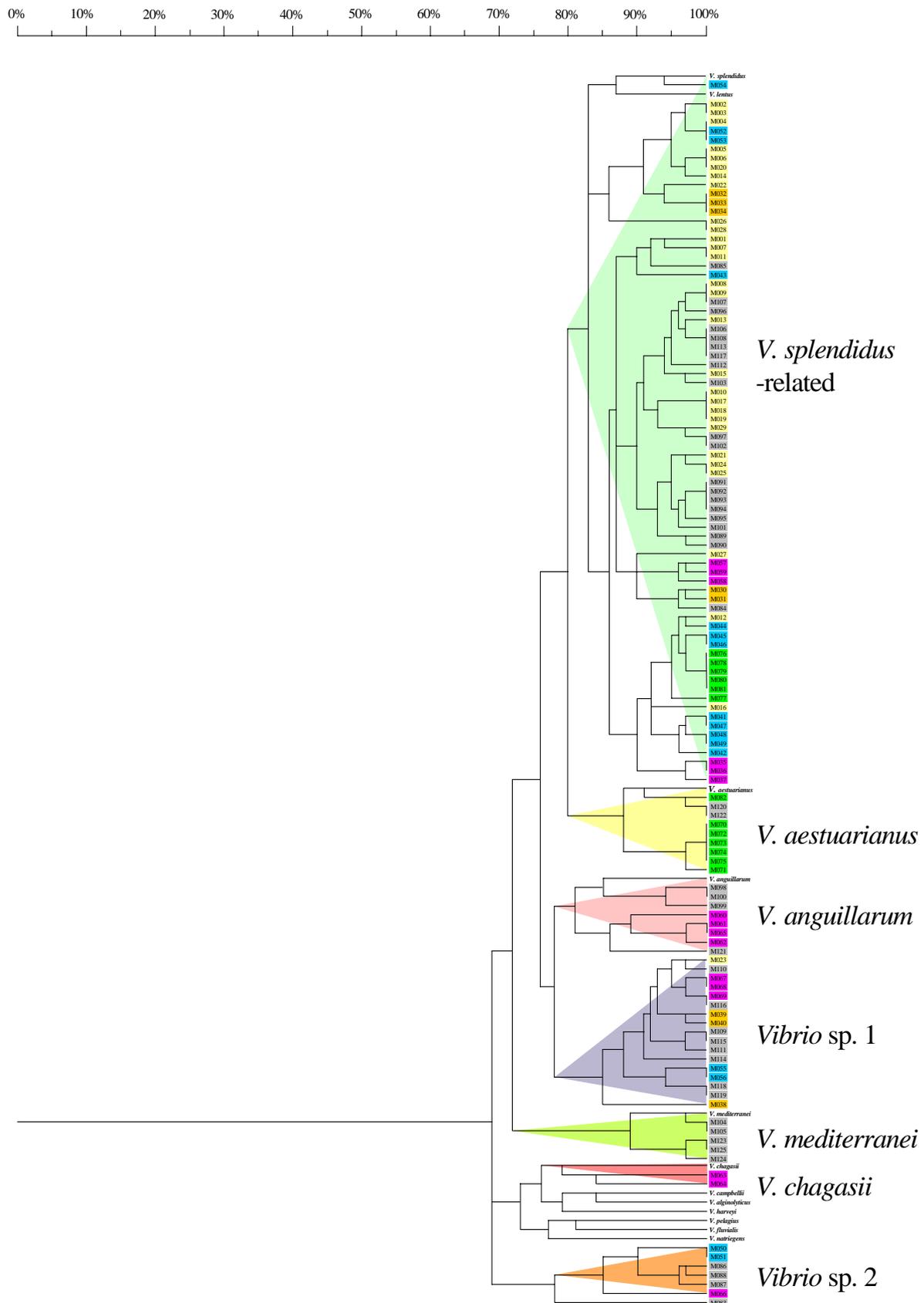


Figure 6 Dendrogramme issu de l'analyse en taxonomie numérique de la collection de souches de *Vibrio*. Les noms de souches sont surlignés en fonction des expérimentations de cohabitation : jaune = Arcachon ; orange = Fouras ; bleu = Perquis ; rose = Nurserie ; vert = Trinité ; gris = témoins négatifs

I.3 - Analyse phylogénétique basée sur la séquence partielle du gène *gyrB*

L'analyse phylogénétique basée sur la séquence partielle (588 pb) du gène *gyrB* est effectuée sur cent quatre souches (Figure 7). Cent une de ces souches sont regroupées en 14 clades supportés par des bootstraps supérieurs à 85 % sauf pour le clade F, et trois souches ne sont regroupées dans aucun clade (3, 64 et 121). Les clades D (5 souches), F (4 souches), J (2 souches), K (3 souches), L (2 souches) et N (5 souches) ne contiennent pas de souches type et sont désignés respectivement *Vibrio* sp. 1 à 6. Le clade A contient 4 souches et la souche type de *Vibrio pelagius*. Le clade B contient 23 souches et la souche type de *V. chagasii*. Le clade C contient 3 souches et la souche type de *V. mediterranei*. Le clade E contient 16 souches et représente une nouvelle espèce *Vibrio crassostreae* (Annexe 3). Le clade G contient 15 souches et représente une nouvelle espèce en cours de description, *Vibrio gigantis* (Le Roux et al., en préparation). Le clade H contient 6 souches et les souches types de *Vibrio kanaloae*, *Vibrio pomeroyi*, *V. lentus* et *Vibrio tasmaniensis*. Le clade I contient 3 souches et la souche type de *V. splendidus*. Le clade M contient 10 souches et la souche type de *V. aestuarianus*. Par comparaison de séquences, les souches du clade K semblent appartenir à l'espèce *Vibrio ordalii*, celles du clade L au genre *Photobacterium* et celles du clade N au genre *Shewanella*.

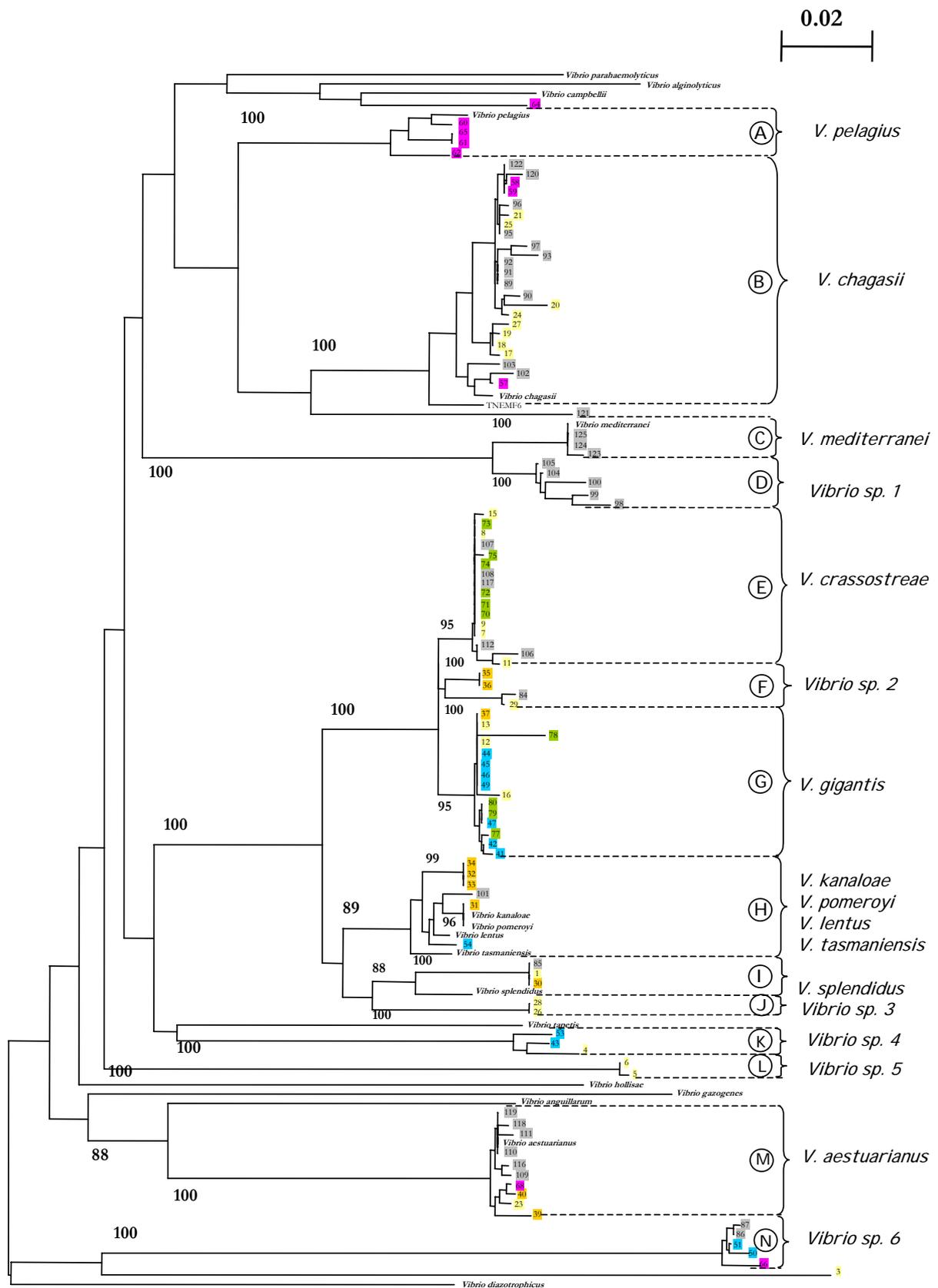


Figure 7. Arbre phylogénétique basé sur les séquences partielles du gène *gyrB* (588 pb). Les noms de souches sont surlignés en fonction des expérimentations de cohabitation : jaune = Arcachon ; orange = Fouras ; bleu = Perquis ; rose = Nurserie ; vert = Trinité ; gris = témoins négatifs.

I.4 - Comparaison des deux méthodes

Les résultats de ces deux analyses ne sont pas systématiquement concordants. Les souches regroupées avec la souche type de *V. aestuarianus* dans l'arbre phylogénétique sont regroupées avec la souche type de *V. anguillarum* dans le dendrogramme, alors que les souches regroupées avec la souche type de *V. aestuarianus* dans le dendrogramme sont dans les mêmes clades que les souches types de *V. crassostreae* et *V. chagasii* dans l'arbre phylogénétique. Selon l'analyse phylogénétique, 69 souches sur 104 analysées sont apparentées au groupe polyphylétique de *V. splendidus* (Annexe 2), comprenant les espèces *V. chagasii*, *V. crassostreae*, *V. gigantis*, *V. kanaloae*, *V. lentus*, *V. pomeroyi*, *V. splendidus* et *V. tasmaniensis*. Sur ces 69 souches, 61 sont également associées à *V. splendidus* en taxonomie numérique, les 8 autres étant regroupées avec la souche type de *V. aestuarianus*. En taxonomie numérique, 77 souches sont regroupées avec les souches types de *V. splendidus* et *V. lentus*. Soixante-sept de ces souches ont été analysées par séquençage de leur gène *gyrB* : 61 appartiennent au groupe polyphylétique de *V. splendidus* et les 6 autres souches appartiennent à des clades ne contenant pas de souche type (*Vibrio* sp. 4 et 5). Donc, en ce qui concerne les souches appartenant au groupe polyphylétique de *V. splendidus*, les résultats des deux techniques sont relativement proches. Le séquençage du gène *gyrB* ne permet pas de séparer les espèces *V. kanaloae*, *V. lentus*, *V. pomeroyi* et *V. tasmaniensis* (Le Roux et al., 2004, Figure 7). En revanche, il permet de distinguer ce groupe de *V. splendidus*, *V. gigantis* et *V. crassostreae*. Le dendrogramme basé sur les résultats des tests phénotypiques ne contient pas les espèces nouvellement décrites (*V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis*, *V. chagasii* et *V. crassostreae*), mais les souches d'un même clade du groupe polyphylétique de *V. splendidus* (B, E, F, G, H ou I) sur l'arbre phylogénétique sont disséminées dans tout le groupe des *V. splendidus* sur le dendrogramme. L'arbre phylogénétique basé sur le séquençage du gène *gyrB* permet donc une meilleure distinction entre les espèces du groupe polyphylétique de *V. splendidus*, résultat concordant avec les résultats précédents (Annexes 2 et 3). De plus, les résultats obtenus avec cette technique sont généralement congruents avec les hybridations ADN/ADN. Le reste de l'analyse taxonomique de la collection de souches sera donc basé sur la figure 7.

I.5 - Diversité de la flore *Vibrionaceae* des cohabitations

Le prélèvement de trois colonies de chaque type morphologique ne permet pas de conclure quant à la dominance ou non d'une souche ou d'une espèce. Pour chaque expérimentation de cohabitation, les souches sont réparties sur 2 à 9 clades (Tableau 5, Figure 7). Les souches de l'expérimentation "Trinité" sont réparties sur 2 clades : *V. crassostreae* et *V. gigantis* et les souches de l'expérimentation "Arcachon" sur 9 : *V. chagasii*, *V. crassostreae*, *V. gigantis*, *V. splendidus*, *V. aestuarianus*, *Vibrio* sp. 2 à 5. Chaque clade contient des souches provenant d'une à quatre expérimentations de cohabitation. Le clade A ne contient que des souches isolées de l'expérimentation "Nurserie" et les clades J et L des souches isolées de l'expérimentation "Arcachon". Le clade G contient des souches isolées des expérimentations "Arcachon", "Fouras", "Perquis" et "Trinité". Les souches isolées des témoins négatifs sont également réparties sur neuf clades (*V. chagasii*, *V. mediterranei*, *V. crassostreae*, *V. kanaloae* – *V. pomeroyi* – *V. lentus* – *V. tasmaniensis*, *V. splendidus*, *V. aestuarianus* et *Vibrio* sp. 1, 2 et 6), mais on peut noter que les souches présentes dans le clade C (*V. mediterranei*) et dans le clade D (*Vibrio* sp. 1) sont toutes isolées des témoins négatifs.

La flore des individus issus des expérimentations de cohabitation est donc relativement diversifiée. Aucun des clades n'est isolé de toutes les expérimentations, en revanche, des souches du groupe polyphylétique de *V. splendidus* sont isolées de toutes les cohabitations. La flore isolée des témoins négatifs n'est pas qualitativement différente de celle isolée des cohabitations (hormis les clades C et D). En revanche, les numérations montrent que la concentration de la flore *Vibrionaceae* de l'hémolymphe des huîtres issues des cohabitations (de l'ordre de 10^6 UFC.mL⁻¹) est toujours supérieure à celle des témoins négatifs (de l'ordre de 10^3 UFC.mL⁻¹).

Tableau 5. Récapitulatif des identifications des souches par expérimentation de cohabitation. Le nombre de souches est indiqué entre parenthèses

Cohabitation	Identification <i>gyrB</i>
Arcachon (25)	<i>V. chagasii</i> (8) <i>V. crassostreae</i> (5) <i>V. gigantis</i> (3) <i>V. splendidus</i> (1) <i>V. aestuarianus</i> (1) <i>Vibrio</i> sp. 2 (1) <i>Vibrio</i> sp. 3 (2) <i>Vibrio</i> sp. 4 (1) <i>Vibrio</i> sp. 5 (2) <i>Vibrio</i> sp. (1)
Fouras (10)	<i>V. gigantis</i> (1) <i>V. kanaloae</i> , <i>V. pomeroyi</i> , <i>V. tasmaniensis</i> , <i>V. lentus</i> (4) <i>V. splendidus</i> (1) <i>V. aestuarianus</i> (2) <i>Vibrio</i> sp. 2 (2)
Perquis (12)	<i>V. gigantis</i> (7) <i>V. kanaloae</i> , <i>V. pomeroyi</i> , <i>V. tasmaniensis</i> , <i>V. lentus</i> (1) <i>Vibrio</i> sp. 4 (2) <i>Vibrio</i> sp. 6 (2)
Nurserie (10)	<i>V. pelagius</i> (4) <i>V. chagasii</i> (3) <i>V. aestuarianus</i> (1) <i>Vibrio</i> sp. 6 (1) <i>Vibrio</i> sp. (1)
Trinité (10)	<i>V. crassostreae</i> (6) <i>V. gigantis</i> (4)
Témoins (37)	<i>V. chagasii</i> (12) <i>V. mediterranei</i> (3) <i>V. crassostreae</i> (5) <i>V. kanaloae</i> , <i>V. pomeroyi</i> , <i>V. tasmaniensis</i> , <i>V. lentus</i> (1) <i>V. splendidus</i> (1) <i>V. aestuarianus</i> (6) <i>Vibrio</i> sp. 1 (5) <i>Vibrio</i> sp. 2 (1) <i>Vibrio</i> sp. 6 (2) <i>Vibrio</i> sp. (1)

I.6 - Sélection de souches virulentes

Les outils taxonomiques disponibles pour les souches de *Vibrio* isolées d'animaux aquatiques ne permettent pas de distinguer les souches virulentes ou non (Annexe 1). La seule technique pour évaluer la virulence d'une souche est de la tester en infection expérimentale. La pathogénicité des souches est évaluée en infection expérimentale par injection dans le muscle

adducteur sur des lots de palourdes. En effet, des études préliminaires à ce travail avaient évalué la virulence d'une collection de souches phénotypiquement proches de *V. splendidus* par différentes techniques d'infection expérimentale : baignade de larves et de naissain de *C. gigas*, injection dans le muscle adducteur de palourdes japonaises (*Ruditapes philippinarum*) et d'huîtres. Les souches pathogènes pour la palourde le sont également pour l'huître, les plus fortes mortalités étant observées chez la palourde (Gay, 2001). D'autre part, en raison du nombre élevé de souches à analyser, un premier criblage est réalisé en injectant des groupes de 3, 4 ou 5 souches. Ces groupes sont constitués par des souches issues d'une même expérimentation de cohabitation (Annexe 6). Chez la palourde, cinq groupes de souches induisent des taux de mortalité supérieurs à 65 % à 4 jours après injection. La virulence de ces cinq groupes sur l'huître est testée en infection expérimentale par injection dans le muscle adducteur. Trois jours après inoculation, les taux de mortalité varient de 0 à 58 %, le groupe constitué des souches 30, 31, 32, 33, apparentées à *V. splendidus*, induisant le plus fort taux de mortalité. Les souches de ce groupe sont ensuite testées en individuel ou en combinaison de 2, 3 ou 4. Les plus forts taux de mortalité sont induits par les couples de souches 31+32 ou 31+33. Le taux de mortalité induit par le couple 31+32 est significativement supérieur à ceux induits par ces souches en individuel ($p < 0.05$). Ce phénomène de collaboration entre souches est également observé pour d'autres couples de souches (6+7, 6+8, 7+8, 13+16, 14+16, 34+37). Par ailleurs, un phénomène d'antagonisme est suspecté pour les couples 34 et 35, 34 et 36, 35 et 36, 35 et 37, : le taux de mortalité induit par la souche 35 est de 46,7 %, celui de la souche 36 est de 23,3 % alors que celui du couple 35+36 est de 18,3 %.

Une partie de ces résultats a été publiée dans *Diseases of Aquatic Organisms* : **Article 1 : Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*.**

Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*

Mélanie Gay, Franck C. J. Berthe, Frédérique Le Roux*

Laboratoire de Génétique et Pathologie, Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (IFREMER),
17390 La Tremblade, France

ABSTRACT: In an attempt to develop a reproducible experimental model of bacterial infection in *Crassostrea gigas*, oysters taken from very localised sub-populations suffering natural mortality outbreaks were used in cohabitation trials under laboratory conditions. From these trials, a collection of *Vibrio* strains was isolated from moribund and healthy oysters. In a second step, strains were experimentally tested for virulence by means of injection into healthy oysters. This screening revealed a span of virulence among isolated strains from none to medium. When pooling injected strains, results suggest increased virulence. *Vibrio* strains may have additive/synergistic action leading to higher *C. gigas* mortality rates in experimental challenges. Although the study initially aimed to develop a simple experimental model, a complex of interactions emerged between several bacterial strains during the pathogenic process in their molluscan host. Selected strains provide a suitable model of experimental disease for further studies and better understanding of bacterial interaction and pathogenesis in *C. gigas*.

KEY WORDS: *Vibrio splendidus* · Virulence · Agonism · Antagonism

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

INTRODUCTION

While experimental transmission of mollusc diseases under laboratory conditions has sometimes been achieved (Bachère et al. 1986, Le Deuff et al. 1994, Chu 1996, Hervio et al. 1996, Audemard et al. 2002), the lack of a reproducible disease model is broadly recognised as an impediment to scientific investigations (Mialhe et al. 1995, Berthe et al. 1998). Diseases caused by non-cultivable pathogenic agents, unknown agents or agents having a complex life-cycle present the most difficulties. Considering this, bacterial infection has the potential for further development of an experimental disease model.

Bacterial diseases in molluscs have been described mainly for the larval stage and in hatcheries, with a marked predominance of the genus *Vibrio* (Tubiash et al. 1965, Brown & Losee 1978, Disalvo et al. 1978, Elston & Leibovitz 1980a,b, Jeffries 1982, Hada et al. 1984, Lambert et al. 1998, Sugumar et al. 1998). Vib-

riosis has also been reported in juvenile and adult molluscs. For example, *Vibrio tapetis* is the aetiological agent of brown ring disease in the Japanese clam *Ruditapes philippinarum* (Paillard & Maes 1990, Borrego et al. 1996), and *V. harveyi* has been associated with a severe epizootic outbreak in the abalone *Haliotis tuberculata* (Nicolas et al. 2002). In the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, 2 potentially pathogenic strains were identified as *V. splendidus* (Lacoste et al. 2001, Waechter et al. 2002, Le Roux et al. 2002), and were associated with summer mortality syndrome outbreaks (Gouletquer et al. 1998).

Vibrio pathogenesis has only been documented in a limited number of molluscan diseases. To date, descriptions were made of *V. tapetis* infection in *Ruditapes philippinarum*, *V. anguillarum* in *Crassostrea gigas* larvae, and *V. lentus* in *Octopus vulgaris* (Elston & Leibovitz 1980a,b, Elston et al. 1982, Oubella et al. 1994, Paillard et al. 1994, Allam et al. 2000, Farto et al. 2003). In adult oysters, vibriosis-induced host tissue

*Corresponding author. Email: fleroux@ifremer.fr

alteration and immune response, as well as virulence mechanism and regulation, are still poorly understood. This could be explained by the absence of clinical signs preceding death of shelled molluscs, the high diversity of the *Vibrio* species involved and the opportunistic status of different strains (Le Roux et al. 2002, Waechter et al. 2002). The development of a robust experimental model would therefore represent major progress.

The main objective of this study was to isolate *Vibrio* strains and screen them for virulence in order to develop an experimental model of vibriosis in *Crassostrea gigas*. The first step of this work was to establish a collection of *Vibrio* potentially pathogenic to *C. gigas*. To achieve this, live oysters from very localised sub-populations suffering summer mortality outbreaks were collected in different areas. In order to enhance the chances of selecting oysters that carry pathogenic *Vibrio* spp., cohabitation experiments were conducted under laboratory conditions, and observed transmissible events enabled us to identify candidates for bacterial isolation. During these trials, a collection of *Vibrio* strains was isolated from moribund and healthy animals followed by their characterisation by means of gyrase subunit (*gyrB*) gene sequencing (Le Roux et al. 2004).

The second step of the study was to select virulent strains. The screening of strains—either individual or pooled strains—was performed by injection challenges using *Crassostrea gigas* after pre-screening in clams *Ruditapes philippinarum*, given the higher susceptibility of the latter species to bacterial infection, as has been previously demonstrated (Le Roux et al. 2002).

MATERIALS AND METHODS

Cohabitation experiments. During summer 2001, live oysters (neighbouring oysters displaying a mortality rate of >20%), were collected from several beds along the Atlantic coast of France and from 1 batch from a hatchery (Table 1). These oysters ($n = 15$, referred to as 'field batch') were kept in aquaria along with healthy oysters from populations which had never suffered from mortality (IFREMER hatchery, $n = 15$, referred to as 'sentinel batch'). Experiments were performed for 1 wk in 2.5 l aquaria filled with 5 μ m-filtered seawater, under static conditions at 20°C with aeration. Oysters were fed daily with a mixture of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans*. During the experiment, sentinel oysters displaying a weakness of adduction activity (moribund oysters) were sacrificed, and the haemolymph was collected for bacterial analysis. For each cohabitation experiment, controls consisted of sentinel oysters maintained under the same conditions; haemolymph samples were collected from healthy animals as described above.

Bacterial isolation. Isolation was performed from the haemolymph in order to avoid contamination from the digestive tract flora where *Vibrio* is predominant (Prieur 1982). Samples of haemolymph were pooled from 3 oysters, serial dilutions spread onto thiosulfate citrate bile sucrose agar (TCBS, Diagnostic Pasteur) and incubated for 48 h at 20°C. Three colonies of each macroscopic type were selected and isolated for sub-culture. The origin and source of the isolations are given in Table 1. All strains were further sub-cultured on tryptic soy agar (TSA) supplemented with 2% NaCl (Difco) at 20°C, and were stored at -80°C in basal medium (1% w/v peptone, 0.1% w/v MgSO₄·7H₂O, 10% v/v glycerol; pH 7.2) in the collection of the EU Community Reference Laboratory for Mollusc Diseases (IFREMER, La Tremblade, France).

Genotyping. Bacterial DNA was prepared according to Sambrook et al. (1989). PCR amplification of the DNA gyrase subunit (*gyrB*) was achieved with primers and methods previously described (Yamamoto & Harayama 1995). Amplified products were purified using a gel extraction kit (Qiagen). Sequencing was carried out using the Sequitherm Excell II kit (Epicentre) and a Li-Cor DNA sequencer (ScienceTec) according to the manufacturer's instructions.

Phylogenetic analyses. *GyrB* sequences were aligned and phylogenetic analyses were performed using Seaview and Phylo-win programs (Galtier et al. 1996). Phylogenetic trees were built using the BIONJ method (Gascuel 1987) applied to Kimura's 2-parameter distances. Reliability of topologies was assessed by the bootstrap method with 1000 replicates.

Experimental challenges. Bacteria were grown at 20°C for 36 h in marine broth (Diagnostic Pasteur) and harvested in sterile seawater (121°C for 15 min) at a

Table 1. *Crassostrea gigas*. Number of moribund oysters obtained after 8 d of cohabitation experiments for field ($n = 15$) and sentinel ($n = 15$) batches. Sentinel batches for which bacteriological analysis was conducted are underlined

Origin/ reference	Cumulative mortality at 8 d post cohabitation	
	Field batch	Sentinel batch
Arcachon 01-84	15	15
Arcachon 01-88	15	8
Arcachon 01-90	15	14
Fouras 01-92	5	10
Fouras 01-94	5	0
Fouras 01-116	8	9
Perquis J1	15	11
Perquis J8	15	15
Hatchery	15	12
Trinité 01-105	0	2
Trinité 01-106	6	3
Trinité 01-111	14	15

concentration of 4 to 8×10^8 colony forming units (CFU) ml^{-1} calculated by reading the optical density (OD) at 600 nm with a spectrophotometer (Biophotometer, Eppendorf). This bacterial concentration was confirmed by enumeration on marine agar plates using a conventional dilution plating technique with incubation at 20°C for 2 d.

A pre-screening of virulent strains was performed using the clam model. Since we could not individually test all 125 strains, bacterial isolates from a cohabitation experiment were injected from a pool of 3 to 5 strains. For this, equal volumes of each strain at the concentration of 4×10^8 CFU ml^{-1} were mixed and 100 μl of this mixture (4×10^7 CFU) was injected into the adductor muscle of adult clams ($n = 30$, size 3 to 5 cm). A negative control consisted of 30 clams injected with sterile seawater. The clams were kept out of water overnight at 20°C and were then maintained for 1 wk in aerated seawater (30 clams in 2.5 l) at 20°C . Animals were fed with phytoplankton every day, as described above.

Crassostrea gigas spat originated from captive samples and measured 4 to 6 cm. To anaesthetise oysters and open the valves, spat were first kept for 2 h in a MgCl_2 bath at a final concentration of 50 g l^{-1} ($2/3$ v/v seawater/freshwater) and supplemented with phytoplankton. A volume of 50 μl of the bacterial suspension (pool or unique, total 4×10^7 CFU ind.^{-1}) was inoculated by injection into the adductor muscle ($n = 30$). Negative controls consisted of a group of 30 oysters injected with sterile seawater. Immediately after injection, oysters were transferred to the aquarium (30 oysters in 2.5 l) containing aerated filtered seawater at 20°C kept under static conditions, and fed as described previously.

Statistical analysis. Four experimental infections were carried out in triplicate. They consisted of injecting sterile seawater (SSW) or the strain (alone/pooled) in the adductor muscle of batches of 30 oysters as described previously. The least significant difference test was carried out on the arcsinus of the mean cumulated mortality rate at 3 d post injection, with a 5% threshold (Cochran & Cox 1957).

RESULTS

Cohabitation

Table 1 shows the results from 12 field batches of live oysters *Crassostrea gigas* that were taken from populations which suffered mortality events in 5 geographic areas (4 in the field, 1 in hatchery) and subsequently maintained with healthy spat, as described in the 'Materials and methods'. In $11/12$ field batches, mortality was observed 1 to 3 d after the experiment began. Seven batches presented a mortality rate

higher than 90% . In the sentinel batch, mortality occurred 3 to 5 d after the experiment started, with a cumulative mortality rate above 50% in $9/12$ cases at 8 d post cohabitation. No mortality was observed in the aquaria containing only sentinel oysters (controls). Sentinel batches used for bacterial isolation (Table 1) were shown to be herpes virus free by PCR (data not shown). Strains 1 to 82 were isolated from diseased animals, whereas Strains 83 to 125 were isolated from healthy controls.

Genotypic characterisation of strains

Sequences were collected and analysed from 104 strains. Cluster analysis by phylogenetic study based on partial *gyrB* sequence (588 bp) demonstrated that the majority of strains ($68/104$ analysed), isolated from diseased or healthy oysters, were included in the recently described *Vibrio splendidus* polyphyletic group (Le Roux et al. 2004). Other strains were included in clades containing *V. aestuarianus* (10 strains), *V. mediterranei* (8 strains) and *V. pelagia* (4 strains) type strains. Fourteen strains were included in distinct clades and have not yet been identified. Concerning the strains selected after experimental challenge, the phylogenetic analysis is given in Fig. 1. The

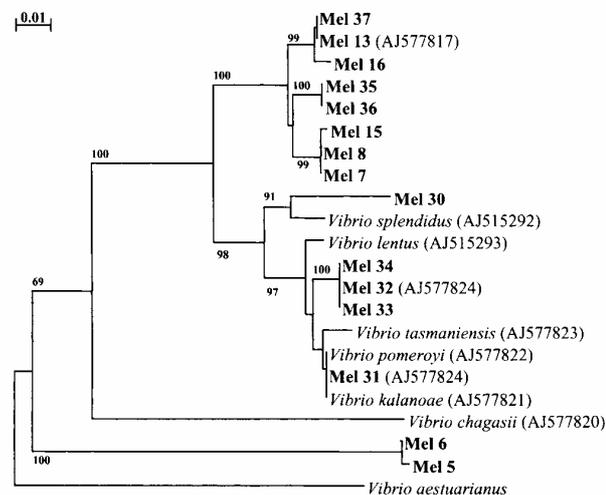


Fig. 1. Phylogenetic tree of partial *gyrB* sequences for *Vibrio splendidus* related strains and 16 strains selected by screening in experimental challenge; 588 gap-free sites were compared. The *V. aestuarianus* homologue Strain 01/32, kindly provided by J. L. Nicolas (IFREMER), was used as outgroup. Horizontal branch lengths are proportional to evolutionary divergence. Significant bootstrap values in percent ($>80\%$) of 1000 replicates appear next to the corresponding branch. EMBL accession numbers follow strain names

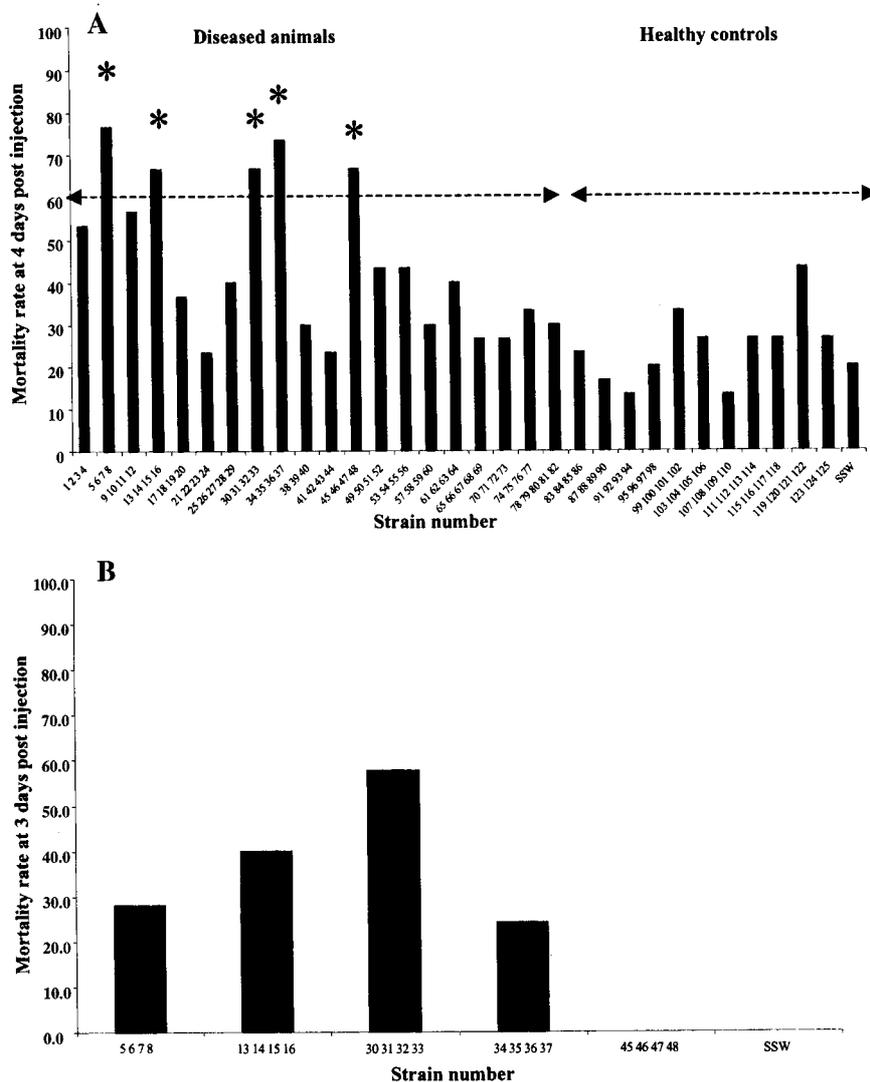


Fig. 2. (A) *Ruditapes philippinarum* and (B) *Crassostrea gigas*. Mortality rate (%) at 4 or 3 d post injection, respectively, of pooled strains to batches of (A) 30 clams or (B) 30 oysters. Strains 1 to 29, 30 to 40, 41 to 56, 57 to 69, and 70 to 82 were isolated after cohabitation experiments with oysters, sampled, respectively, in Arcachon, Fouras, Perquis, hatchery and Trinité. Strains 83 to 125 were isolated from healthy animals. Sterile sea water (SSW) was injected as negative control. Asterisks in (A) mark the *Vibrio* pools causing highest mortality, which were then used for oysters (B)

first clade, supported by a bootstrap value of 100%, included Strains 37, 13, 16, 35, 36, 15, 8 and 7. This clade could be divided in subgroups according to bootstrap values of 99 to 100%. A second clade, showing a bootstrap value of 91%, grouped the *V. splendidus* type strain and Strain 30. *V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis* and *V. lentus* were clustered with Strains 34, 32, 33 and 31. *GyrB* phylogenetic analyses did not lead to a clear discrimination of these species, in agreement with a previous study (Le Roux et al. 2004). Strains 5 and 6 were clearly discriminated from *V. splendidus* related strains and clustered in a 4th clade.

Screening of virulent strains by experimental challenge

The first screening of virulent strains was performed in clams. Three to 5 strains isolated from the same experimental batch described above were pooled (31 groups) and injected in oysters (Fig. 2A). An equal volume of sterile seawater was injected as a negative control (SSW). The 5 pools of *Vibrio* showing the highest mortality rates (68 to 78%), marked by an asterisk, were selected to be injected in oysters (Fig. 2B). Three days post-injection, no mortality was observed in the

case of pooled Strains 45, 46, 47, 48 and the SSW. Four pools of bacterial strains induced 23 to 58% mortality, and these were selected for further experimental infections.

The first pool tested contained Strains 30, 31, 32 and 33 isolated from a unique geographic area and mortality event (Fig. 3A). These strains were injected alone, as well as in pools of 2, 3 or 4 strains. Three days post-injection, Strains 30, 31, 32 and 33 gave mortality rates of 12, 30, 22 and 25%, respectively, which was lower than the mortality obtained with grouped bacteria (40%). When Strains 31, 32 or 33 were injected together with Strain 30, the mortality rate was similar to the 4 strains pooled. However, the highest mortality rate was obtained when Strain 31 was injected with Strain 32 or 33 (60%).

In order to evaluate the reproducibility of this phenomena, 4 experimental infections were carried out in triplicate. A least significant difference test demonstrated that the virulence of Strains 31 and 32 injected together was significantly higher than when injected individually.

Different quantities (10^5 to 10^7) of Strains 31 and/or 32 were tested by injection, and 10^7 CFU ind.⁻¹ was demonstrated to be necessary to induce significant mortality.

Additional experiments were conducted with strains belonging to other selected pools (Fig. 3B). Strains 7 and 8 had a higher virulence than Strains 5 and 6. Strain 5 injected with 6, 7 and 8 yielded a mortality rate equivalent to those induced by individual strains. The highest levels of mortality were obtained when Strains 7 and 8, 6 and 8, or 6 and 7 were coinjected.

Strain 15 injected alone induced the highest mortality rate (55%), and Strain 16 the lowest (5%) (Fig. 3C). Cumulative effects were observed when Strains 13 or 14 were injected with Strain 16.

Strain 35 injected alone induced the highest mortality rate (50%) (Fig. 3D). A cumulative effect was observed when Strain 34 was injected with Strain 37.

A decreased mortality rate was observed when Strains 15 or 35, presenting the highest virulence, were injected with other strains.

DISCUSSION

The development of an experimental model of vibriosis in *Crassostrea gigas* represents a pivotal step in the study of this disease, in addition to a better understanding of the modulation of host immune response with respect to pathogen response and physiological stress.

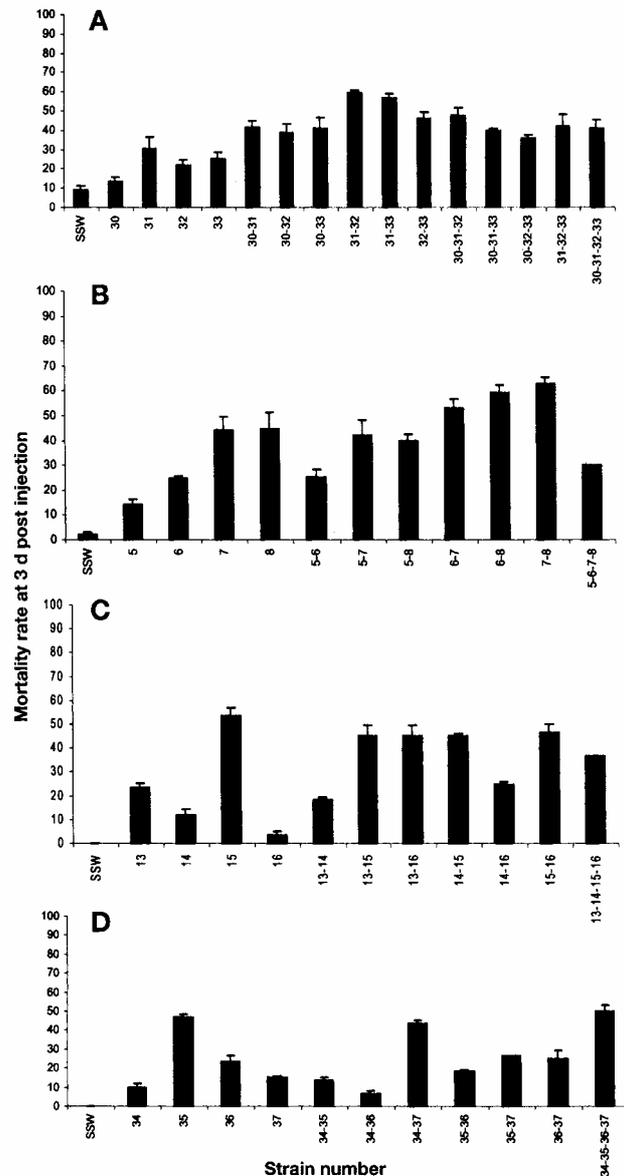


Fig. 3. *Crassostrea gigas*. Mortality rate (%) in batches of 30 oysters at 3 d post injection of strains: (A) Strains 30, 31, 32, and 33 injected individually, or in mixtures of 2, 3 and 4 strains; (B) Strains 5, 6, 7, and 8 injected individually or in mixtures of 2 and 4; (C) Strains 13, 14, 15, 16 injected individually, or in mixtures of 2 and 4; and (D) Strains 34, 35, 36, and 37 injected individually, or in mixtures of 2 and 4. Sterile seawater (SSW) was injected as negative control. All experiments were performed in triplicate

In this study, strains were isolated from diseased oysters and healthy controls following cohabitation experiments. The molecular characterisation showed a genetic diversity suggesting that several species and

strains could have been involved in these selected mortality events. Most of the strains from the established collection belong to the *Vibrio splendidus* polyphyletic group (Le Roux et al. 2004), isolated from either diseased or healthy animals. The strains belonging to a given clade, as delineated by the *gyrB* analysis (Fig. 1), displayed virulence ranging from low to medium induced mortality as observed by experimental exposure. These data show no relation between taxonomic affiliation and potential virulence. This precludes the use of bacterial identification in anticipating the cause or origin of mortality. A practical consequence is that the virulence of isolated strains has to be assessed by experimental challenge. This also emphasises the need for identification of new targets for diagnostic tools, and underlines the need for further investigations of virulence to be undertaken based on comparative approaches in the *V. splendidus* group.

For the purpose of pre-screening virulent bacterial strains, isolates were initially injected as pools of strains in clams *Ruditapes philippinarum*. This was justified by a high susceptibility of this mollusc species to infection by *Vibrio splendidus*-related strains (Le Roux et al. 2002), as well as robust reproducibility of experimental results (unpubl. data). In this host, 5 pools out of 31 induced increased mortality rates, i.e. higher than those observed in controls. Among these 5 pools, 4 also caused mortality of oysters *Crassostrea gigas*, but at a lower level. However, one cannot exclude the possibility that strains could be pathogenic for oysters and not for clams. This could have occurred and requires further challenge trials to be more fully assessed.

The results obtained during the present study have demonstrated that some strains are virulent for both host species: clams and oysters. Independently of the host they infect, these strains could share a common mechanism—genetic and/or metabolic—providing potential for pathogenicity. The strains related to *Vibrio splendidus* are widely distributed in various environments (Nealson et al. 1993, Farto et al. 1999), they display an elevated genetic diversity and, according to the literature, may be associated with mortality in a broad range of aquatic animals (Nicolas et al. 1996, Sugumar et al. 1998, Gatesoupe et al. 1999, Lacoste et al. 2001, Waechter et al. 2002, Farto et al. 2003). In contrast, various *Vibrio* species, including *V. pectinica*, *V. tapetis*, and *V. penaeicida*, have a narrower host specificity and consistent pathogenicity. These contrasting situations raise questions regarding genome plasticity and, more specifically, virulence gene acquisition between bacterial strains.

Among the selected isolates, 2 strains, namely 15 and 35, induced a mortality rate exceeding 50% when injected alone. These strains could be used for further development of an experimental infection model in

Crassostrea gigas. At this stage of the study, that only 2 strains responded to our quest could be seen as a poor result. Meanwhile, the use of pooled strains in our experimental protocol to perform injection challenges opened new prospects.

When these strains were injected in association with other strains, a decreased mortality rate was observed, suggesting an antagonistic mechanism. This antagonism was particularly clear when Strains 35 and 36 were co-injected. Antagonism between *Vibrio* species has previously been demonstrated. For instance, *V. alginolyticus* is known to reduce the pathogenicity caused by *V. anguillarum* and *V. ordalii* in fish (Austin et al. 1995) or infection with *V. parahaemolyticus* in shrimp (Garriques & Arevalo 1995). Some strains, such as 36, may represent good candidates for probiotic development, because of the apparent protection they provide in addition to being part of the same microbial communities as pathogenic strain(s). This is practically implemented in hatcheries to improve seed production (Verschuere et al. 2000); however, this approach presents a potential problem with respect to reversion to and acquisition of virulence. For example, in our study Strain 37 reduces the pathogenicity of Strain 35, while boosting it in Strain 34 (Fig. 3D).

Strains 30, 31, 32 and 33 belonged to the most virulent pool. When analysing this pool by injection of single or multiple strains, strain pairs appeared to induce increased mortality rates similar to the Strain 34/37 association cited above (Fig. 3). The noteworthy association of Strains 31 and 32 induced significantly higher mortality than each of these strains injected individually. This effect was also observed with strains belonging to other pools, which suggests that different *Vibrio* strains share this ability, when associated, of an increased individual pathogenicity through additive/synergistic mechanisms. Interactions between bacteria have previously been documented (Pasmore & Costerton 2003). In addition, a positive collaboration of periodonto-pathogens has been suggested to induce abscess lesions in a mouse model (Ebersole et al. 1995).

Experimental challenges based on the injection of oysters with pooled cultures of Strains 31 and 32 show a statistically significant reproducibility, and this robustness was a major argument for retaining these strains in future experiments. This model enables the investigation of mechanisms leading to a cumulative effect of virulent strains. Experiments are in progress to elucidate the sequence of events or simultaneous interactions of the bacteria initiating and exacerbating the disease process. It is unknown whether the observed phenomenon reveals synergy-based effects on an interdependence of certain mechanisms of virulence, or additive effects stemming from reciprocal benefits and facilitated counteraction of the host immune response.

To conclude, this study initially aimed at developing a simple experimental model, but led us to envision a complex of interactions between several bacterial strains during the pathogenic process in their molluscan host.

Acknowledgements. The authors acknowledge Mr Girardeau and Mr Auvray for providing oysters and clams, Prof B. Austin, Drs F. Thompson, Tim Sharbel and D. Saulnier for critically reading the manuscript, and Dr. P. Soletchnik for statistical analyses. This study was carried out with financial assistance from the EU Community Reference Laboratory and Région Poitou-Charentes.

LITERATURE CITED

- Allam B, Paillard C, Auffret M (2000) Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* challenged with its pathogen, *Vibrio tapetis*. *J Invertebr Pathol* 76:63–69
- Audemard C, Le Roux F, Barnaud A, Collins C and 6 others (2002) Needle in a haystack: involvement of the copepod *Paracartia grani* in the life cycle of the oyster pathogen *Marteilia refringens*. *Parasitology* 124:315–323
- Austin B, Stuckey LF, Robertson PAW, Effendi I, Griffith DRW (1995) A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicidae*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J Fish Dis* 18:93–96
- Bachère E, Comps M, Grizel H (1986) Infections expérimentales de l'huître plate *Ostrea edulis* L. par le protozoaire *Bonamia ostreae*. In: Vivarès CP, Bonami JR, Jaspers E (eds) Pathology in marine aquaculture. European Aquaculture Society, Spec Publ No. 9. Bredene, Belgium, p 127–132
- Berthe FCJ, Pernas M, Zerabib M, Haffner P, Thébaud A, Figueras AJ (1998) Experimental transmission of *Marteilia refringens* with special considerations for its life cycle. *Dis Aquat Org* 34:135–144
- Borrego JJ, Castro D, Luque A, Paillard C, Maes P, Garcia MT, Ventosa A (1996) *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *Int J Syst Bacteriol* 46:480–484
- Brown C, Losee E (1978) Observations on natural and induced epizootics of vibriosis in *Crassostrea virginica* larvae. *J Invertebr Pathol* 31:41–47
- Chu FLE (1996) Laboratory investigations of susceptibility, infectivity, and transmission of *Perkinsus marinus* in oysters. *J Shellfish Res* 15:57–66
- Cochran WG, Cox GM (1957) Experimental designs, 2nd edn. John Wiley & Sons, New York
- Disalvo LH, Blecka J, Zebal R (1978) *Vibrio anguillarum* and larval mortality in a California coastal shellfish hatchery. *Appl Environ Microbiol* 35:219–221
- Ebersole JL, Kesavalu L, Schneider SL, Machen RL, Holt SC (1995) Comparative virulence of periodontopathogens in a mouse abscess model. *Oral Dis* 1:115–28
- Elston R, Leibovitz L (1980a) Detection of vibriosis in hatchery reared larval oysters: correlation between clinical, histological and ultrastructural observations in experimentally induced disease. *Proc Nat Shellfish Assoc* 70:122–123
- Elston R, Leibovitz L (1980b) Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oysters, *Crassostrea virginica*. *Can J Fish Aquat Sci* 37:964–978
- Elston R, Elliot EL, Colwell, RR (1982) Conchiolin infection and surface coating *Vibrio*: shell fragility, growth depression and mortalities in cultured oysters and clams, *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* and *Mercenaria mercenaria*. *J Fish Dis* 5:265–284
- Farto R, Montes M, Perez MJ, Nieto TP, Larsen JL, Pedersen K (1999) Characterization by numerical taxonomy and ribotyping of *Vibrio splendidus* biovar I and *Vibrio scophthalmi* strains associated with turbot cultures. *J Appl Microbiol* 86:796–804
- Farto R, Armada SP, Montes M, Guisande JA, Perez MJ, Nieto TP (2003) *Vibrio lentus* associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*). *J Invertebr Pathol* 83(2): 149–56
- Galtier N, Gouy M, Gautier C (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* 12: 543–548
- Garriques D, Arevalo G (1995) An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. In: Browdy CL, Hopkins JS (ed) Swimming through troubled water. Proc Spec Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA
- Gascuel O (1987) BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol Biol Evol* 14:685–695
- Gatesoupe FJ, Lambert C, Nicolas JL (1999) Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *J Appl Microbiol* 87:757–763
- Gouletquer P, Soletchnik P, Le Moine O, Razet D, Geairon P, Faury N, Taillade S (1998) Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes Oléron (France). *Proc ICES Mariculture Committee CM 1998/CC*, Copenhagen, p 14–21
- Hada HS, West PA, Lee JV, Stemmler J, Colwell RR (1984) *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve molluscs. *Int J Syst Bacteriol* 34:1–4
- Hervio D, Bower SM, Meyer GR (1996) Detection, isolation, and experimental transmission of *Mikrocytos mackini*, a microcell parasite of Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J Invertebr Pathol* 67:72–79
- Jeffries VE (1982) Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 29: 201–226
- Lacoste A, Jalabert F, Malham S, Cueff A, Gélébart F, Cordevant C, Lange M, Poulet SA (2001) A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis Aquat Org* 46:139–145
- Lambert C, Nicolas JL, Cilia V, Corre S (1998) *Vibrio pectenicida* sp. nov. a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. *Int J Syst Bacteriol* 48:481–487
- Le Deuff RM, Nicolas JL, Renault T, Cochennec N (1994) Experimental transmission of herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Bull Eur Fish Pathol* 142:69–71
- Le Roux F, Gay M, Lambert C, Waechter M, Poubalanne S, Chollet B, Nicolas JL, Berthe FCJ (2002) Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquat Living Resour* 15:251–258
- Le Roux F, Gay M, Lambert C, Nicolas JL, Gouy M, Berthe FCJ (2004) Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus* related strains based on *gyrB* gene sequences. *Dis Aquat Org* 58:143–150

- Mialhe E, Bachère E, Boulo V, Cadoret JP and 6 others (1995) Future of biotechnology-based control of disease in marine invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 4:275–283
- Nealson KH, Wimpee B, Wimpee C (1993) Identification of *Vibrio splendidus* as a member of the planktonic luminous bacteria from Persian Gulf and Kuwait region with LuxA probes. *Appl Environ Microbiol* 59:2684–2689
- Nicolas JL, Corre S, Gauthier G, Robert R, Ansquer D (1996) Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis Aquat Org* 27:67–76
- Nicolas JL, Basuyaux O, Mazurie J, Thebault A (2002) *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Dis Aquat Org* 50:35–43
- Oubella R, Paillard C, Maes P, Auffret M (1994) Changes in hemolymph parameters in the manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia) following bacterial challenge. *J Invertebr Pathol* 64:33–39
- Paillard C, Maes P (1990) Etiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum*: pathogénicité d'un *Vibrio* sp. *CR Acad Sci Paris* 310:15–20
- Paillard C, Maes P, Oubella R (1994) Brown ring disease in clams. *Annu Rev Fish Dis* 4:219–240
- Pasmore M, Costerton JW (2003) Biofilms, bacterial signaling, and their ties to marine biology. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30:407–13
- Prieur D (1982) The microflora of the digestive tract of marine bivalves: experimental study of the mussel, *Mytilus edulis*. *Proc 7th Int Malacological Congress*, August 31 to September 7, 1980, Perpignan. *Malacologia* 22:653–658
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, New York
- Sugumar G, Nakai T, Hirata Y, Matsubara D, Muroga K (1998) *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis Aquat Org* 33:111–118
- Tubiash HS, Chanley Pe, Leifson E (1965) Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *J Bacteriol* 90:1036–1044
- Verschuere L, Robaut G, Sorgeloos P, Verstraete W (2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol* 64:655–671
- Waechter M, Le Roux F, Nicolas JL, Marissal E, Berthe F (2002) Characterisation of *Crassostrea gigas* spat pathogenic bacteria. *CR Acad Sci* 325:231–238
- Yamamoto S, Harayama S (1995) PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl Environ Microbiol* 61:1104–1109

Editorial responsibility: David Bruno,
Aberdeen, UK

Submitted: October 29, 2003; Accepted: February 12, 2004
Proofs received from author(s): April 6, 2004

II - Etude de l'infection expérimentale par les souches 31 et 32 proches de *V. splendidus* : taxonomie, altérations tissulaires et cellulaires

Les altérations induites par les souches du genre *Vibrio* chez les organismes d'intérêt aquacole sont variables : septicémie hémorragique du poisson pour *V. anguillarum* (Austin & Austin, 1999) ; dépôt organique brunâtre sur la coquille interne de la palourde pour *Vibrio tapetis* (Paillard et al., 1994) ; lésions du pied de l'ormeau pour *Vibrio fluvialis* II (Li et al., 1998). Bien que des souches de *Vibrio* aient été identifiées comme responsables de mortalités chez *C. gigas*, ni les symptômes macroscopiques ni les lésions tissulaires n'ont été décrits. Lors des épisodes de mortalités estivales, la seule altération macroscopique observée est une faiblesse du muscle adducteur précédant la mort. Ce symptôme est observé fréquemment en cas de faiblesse de l'animal quelle qu'en soit la cause (Comps, 1988 ; Poulet et al., 2003) et ne peut donc être utilisé pour le diagnostic.

Au cours de la partie précédente, un phénomène original a été présenté : en infection expérimentale, dans certains cas, deux souches, injectées ensemble, induisent des taux de mortalité supérieurs à ceux obtenus avec ces mêmes souches en individuel. Ce phénomène ayant été statistiquement testé pour 31+32, ce couple est sélectionné pour développer une infection expérimentale. L'objectif de cette partie est de présenter la caractérisation de ces souches et leurs effets sur l'huître. La position taxonomique de ces souches est analysée par une approche polyphasique. D'autres techniques d'infection expérimentale, moins invasives et donc plus proches de l'infection naturelle que l'injection dans le muscle adducteur, sont testées. Afin d'évaluer la virulence de chacune de ces souches dans cette collaboration, les altérations induites après infection expérimentale sont décrites par analyse en microscopie photonique et électronique à transmission et les effets de ces bactéries sur les hémocytes sont observés en cytométrie en flux.

II.1 - Taxonomie

L'analyse en taxonomie numérique basée sur 80 caractères fait apparaître que les souches 31 et 32 présentent plus de 80 % de similitude avec les souches types des espèces appartenant au groupe polyphylétique de *V. splendidus* (*V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis*, *V. lentus*, *V. chagasii*, *V. crassostreae*, *V. gigantis* et *V. splendidus*). Sur l'arbre issu de l'analyse phylogénétique basée sur le gène de l'ARN 16S (1200 pb) (Figure 1 de l'article 2), le clade

formé par les souches 31 et 32 et les souches types des espèces *V. tasmaniensis*, *V. lentus* et *V. splendidus* est supporté par une valeur de bootstraps de 95 %. Sur l'arbre issu de l'analyse phylogénétique basée sur le gène *gyrB* (1200 pb), les résultats sont comparables à ceux obtenus précédemment (sur 588 pb, Figure 7) : la souche 32 est séparée d'un clade comprenant la souche 31 et les souches types des espèces *V. kanaloae*, *V. tasmaniensis* et *V. pomeroyi* avec une valeur de bootstraps de 100 %. L'ADN marqué des souches 31 et 32 est utilisé comme sonde dans des hybridations ADN/ADN avec les ADN des souches 31, 32, LMG 20539^T (*V. kanaloae*), LMG 20537^T (*V. pomeroyi*), CIP 107166^T (*V. lentus*), LMG 4042^T (*V. splendidus*), LMG 21359^T (*Vibrio cyclitrophicus*). Les taux d'hybridation s'échelonnent entre 40% (31 - *V. cyclitrophicus*) et 92% (31 - *V. kanaloae*). Les sondes des souches 31 et 32 ont un taux de réassociation supérieur à 70 % avec *V. kanaloae* (respectivement 92 et 87 %), *V. pomeroyi* (respectivement 72 et 76 %) et *V. tasmaniensis* (Le Roux, comm. pers.). Les souches 31 et 32 font donc partie du groupe polyphylétique de *V. splendidus*, et sont proches de *V. kanaloae*, *V. pomeroyi* et *V. tasmaniensis*.

II.2 - Techniques d'infection expérimentale

Les souches 31 et/ou 32 sont injectées dans la cavité palléale de lots d'huîtres. Les mortalités apparaissent 7 jours après l'inoculation. Après 21 jours, les taux de mortalité sont de 18,6 % pour l'EDMAS (eau de mer artificielle stérile), 29,5 % pour la souche 31, 19,2 % pour la souche 32 et 36 % pour le couple 31+32.

Les balnéations dans de l'EDMAS ou dans des suspensions bactériennes des souches 47 (*V. gigantis*, témoin négatif), 31, 32 et du couple 31+32 n'induisent aucune mortalité trente jours après inoculation.

II.3 - Altérations tissulaires

Des lots d'huîtres sont inoculés avec les souches 47 (*V. gigantis*, souche peu pathogène), 31, 32 ou avec le couple 31+32 par injection dans le muscle adducteur. Un lot témoin ne reçoit que de l'EDMAS en injection. Dès l'apparition des mortalités, soit 24 h après injection, des animaux vivants et moribonds (présentant une faiblesse du muscle adducteur) sont prélevés pour analyse en histologie et microscopie électronique à transmission. Par ailleurs, des lots d'huîtres sont inoculés avec les souches 31, 32 ou avec le couple 31+32 par injection dans la cavité palléale. Comme précédemment, un lot témoin ne reçoit que de l'EDMAS. Les

huîtres présentant une faiblesse du muscle adducteur sont prélevées pour analyse histologique. Quel que soit le mode d'inoculation des souches 31 et/ou 32, les lésions tissulaires et les localisations des bactéries sont identiques.

Suite à l'injection intramusculaire de la souche 47, quelques rares bactéries sont visibles dans le muscle adducteur. Les bactéries 31 et/ou 32 sont localisées en petits foyers à la périphérie du muscle adducteur, soit entre les faisceaux musculaires, soit dans le tissu conjonctif entourant le muscle, soit dans le rein (Figures 2 et 3 de l'article 3). Aucune bactérie n'est observée dans les sinus veineux ou dans le cœur.

Suite à l'injection d'eau de mer stérile ou de la souche 47, les organes apparaissent intacts, excepté pour le muscle adducteur de quelques individus injectés avec la souche 47 qui présentent des lésions localisées. L'organe le plus affecté par l'injection de 31 et/ou 32 est le muscle adducteur, et plus particulièrement la zone translucide de cet organe. En revanche, la majorité des autres organes est intacte, excepté la présence d'infiltrations dans les branchies et le tissu conjonctif du manteau chez la moitié des individus analysés. Trois types de lésions sont observés au niveau du muscle adducteur (Figure 4 de l'article 3) : 1) présence de fibres musculaires arrondies contenant un matériel granuleux et hétérogène entouré d'un halo translucide ; 2) présence de matériel hétérogène dans le cytoplasme des fibres de faisceaux musculaires entiers ; 3) altération de grandes zones du muscle avec des fibres musculaires dont le contenu cytoplasmique est très condensé. En microscopie électronique à transmission, les fibres musculaires présentent une membrane intacte alors que la densité de myofibrilles est fortement diminuée. Quelques individus présentent de très fortes infiltrations associées au troisième type de lésion, laissant supposer un phénomène de cicatrisation. Cependant, la grande majorité des individus injectés avec 31 et/ou 32 ne présente pas d'infiltration hémocytaire notable associée aux lésions.

Les observations histologiques associent donc l'infection expérimentale avec les souches 31 et 32 à une maladie du muscle adducteur. Plusieurs types de lésions sont observés, mais les phénomènes impliqués ne semblent pas être nécrotiques, puisque la membrane cellulaire n'est pas altérée. Un fait marquant est l'absence d'infiltration hémocytaire chez la majorité des individus observés. Les techniques utilisées ne permettent pas de mettre en évidence des lésions spécifiques de chaque souche.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans *Diseases of Aquatic Organisms* (épreuves non corrigées) : **article 2 : Two *Vibrio splendidus*-related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations**

Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations

Mélanie Gay¹, Tristan Renault¹, Anne-Marie Pons², Frédérique Le Roux^{1,*}

¹Laboratoire de Génétique et Pathologie, Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Ifremer), 17390 La Tremblade, France

²Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Bio-Organique, CNRS FRE 2766, Université La Rochelle, Pôle Sciences, 17042 La Rochelle Cedex, France

ABSTRACT: For several years, strains phenotypically related to *Vibrio splendidus* have been associated with mortality outbreaks of molluscs. A former study on *Crassostrea gigas* demonstrated the genetic diversity of *V. splendidus* strains associated with diseased animals. Another study suggested that different strains may act in an additive/synergistic way leading to higher *C. gigas* mortality rates. Here, a strain pair (31+32) was characterised at taxonomic and virulence levels. Using a polyphasic approach, these strains were confirmed to be *V. splendidus*-related, without a clear discrimination between *V. kanaloae* and *V. pomeroyi* since hybridisation rates with both these strains were above 70%. Following experimental infection of *C. gigas* by injection in the adductor muscle or in the pallial cavity, the host alterations induced were described. After injection of strains 31 and/or 32, bacteria were localised at the periphery of the muscle and induced extensive lesions of the translucent part of the adductor muscle. Muscle alterations were of 3 kinds: (1) presence of isolated rounded muscular fibres containing non-homogenous granular material and surrounded by a translucent halo; (2) presence of non-homogenous granular material in the cytoplasm of entire muscle bands; (3) affection of wide muscle areas with extremely condensed muscle fibres. Infiltration associated with these lesions was notably absent in the vast majority of the individuals.

KEY WORDS: Vibriosis · Agonism · Molecular taxonomy · Histopathology

—Resale or republication not permitted without written consent of the publisher—

INTRODUCTION

Vibrio splendidus (Baumann et al. 1980, Baumann & Schubert 1984) is widely distributed in marine ecosystems (Nealson et al. 1993, Farto et al. 1999). It has long been considered an environmental organism with no pathogenic significance (Baticados et al. 1990, Pailard & Maes 1990, Myhr et al. 1991, Castro et al. 1992). However, for several years, different strains phenotypically related to this species have been associated with mortalities of molluscs, including *Pecten maximus* (Nicolas et al. 1996), *Crassostrea gigas* (Sugumar et al. 1998, Lacoste et al. 2001, Waechter et al. 2002) and *Octopus vulgaris* (Farto et al. 2003), and fish, *Scophthalmus maximus* (Gatesoupe et al. 1999). The present

controversial status of *V. splendidus* (pathogenic/opportunistic) seems to be due to a lack of pertinent diagnostic tools for its identification and for the evaluation of its potential pathogenic capacity.

Epidemiological studies of *Vibrio splendidus* strains associated with mollusc mortality outbreaks have demonstrated the genetic diversity within this group and suggested its polyphyletic nature (Le Roux et al. 2002, 2004). At least 4 species, *V. lentus*, *V. kanaloae*, *V. pomeroyi* and *V. chagasii*, phenotypically related to *V. splendidus* have been described on a molecular basis (gyrase B subunit, *gyrB*, and 16S rRNA sequences, and Amplified Fragment Length Polymorphisms), although no biochemical method is available to clearly discriminate species within this group (Macian et al. 2001,

*Corresponding author. Email: fleroux@ifremer.fr

Thompson et al. 2003a,b). Therefore, taxonomic identification of *V. splendidus* related strains should be conducted using a polyphasic approach employing new phenotypic tests and molecular techniques (Thompson et al. 2001, Stackenbrandt et al. 2002, Le Roux et al. 2004).

A wide range of virulence among strains related to *Vibrio splendidus* has been observed by experimental exposure on different animal models (Sugumar et al. 1998, Farto et al. 1999, Gatesoupe et al. 1999, Le Roux et al. 2002, Gay et al. 2004). Studies of ribosomal and *gyrB* gene polymorphisms or RAPD have not led to the identification of markers associated with pathogenicity. Thus, so far, there is no phenotypic or genotypic feature to distinguish pathogenic from non-pathogenic strains, and the only way to determine the virulence of a given strain remains experimental infection. However, results may vary from one trial to another. The development of cellular and/or molecular tests to evaluate the potential virulence of strains is necessary. The development of such bioassays requires preliminary descriptions of host alterations to define the virulence mechanisms implicated in the pathogenesis.

Although *Vibrio splendidus*-related strains have been associated with outbreaks of mortality among several aquatic animals, pathogenesis has not yet been well defined. Martin et al. (2002) described some *V. splendidus* strains inducing tissue necrosis and mass mortality in gorgons (*Paramuricea clavata*, *Eunicella cavolinii* and *E. singularis*). A *V. lentus* strain, isolated from diseased octopus (*Octopus vulgaris*), is able to induce round, hard lesions in the arm or head mantle (Farto et al. 2003). However, so far, there has been no histological description following experimental or natural exposure of bivalves to *V. splendidus* related strains.

In a former study, a collection of *Vibrio* strains isolated from *Crassostrea gigas*, genotyped by *gyrB*-based phylogenetic analysis and screened for their virulence by experimental infection, was established (Gay et al. 2004). Few strains displayed an individual pathogenicity; however, quite an important number of strains displayed an enhanced virulence when concomitantly inoculated, suggesting an agonistic action. In particular, this collaboration has been shown to be statistically significant for the strains 31 and 32. These 2 strains appear closely related but may each possess a specific virulence feature, which, when simultaneously expressed, leads to an increased pathogenicity.

In the present study, these strains were taxonomically characterised using a polyphasic approach (16S and *gyrB* gene sequence analysis, DNA/DNA hybridisation, and numerical taxonomy). Light and transmission electron microscopy examination was carried out on oysters following different inoculation methods (intrapalleal or intramuscular injection) of the strains 31 and/or 32 to describe common and specific tissular alterations.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains. The strains used in this study were either isolated from haemolymph of oysters suffering from summer mortality outbreaks (31, 32, 47) (Gay et al. 2004) or purchased from national collections (CIP: Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France; LMG: Laboratorium voor Mikrobiologie, Universiteit Gent, Belgium). Strains are maintained at the European Community Reference Laboratory for Molluscs Diseases as part of the collection at Centre de Ressources Biologiques (Laboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER, La Tremblade, France).

Phenotypic characterisation. Phenotypic profiles of strains and numerical taxonomy were determined from 80 classical biochemical tests as described in Le Roux et al. (2004). The following reference strains were included in the numerical analysis: *Vibrio splendidus* (LMG 4042^T), *V. lentus* (CIP 107166^T), *V. chagasii* (TNEMF6), *V. aestuarianus* (01/32), *V. mediterranei* (CIP 103203^T), *V. campbellii* (CIP 7067), *V. alginolyticus* (LMG 4409), *V. harveyi* (CIP 105197), *V. pelagius* (LMG 3897^T), *V. fluvialis* (CIP 103355^T), *V. natriegens* (LMG 10935^T).

Phylogenetic analyses. DNA extraction, 16S rDNA and DNA gyrase subunit (*gyrB*) amplification and sequencing were performed using primers and methods previously described (Le Roux et al. 2004). Sequences were aligned and phylogenetic analyses were performed using Seaview and Phylo-win programs (Galtier et al. 1996). Phylogenetic trees were built using the BIONJ method (Gascuel 1987) applied to Kimura's 2-parameter distances. Reliability of topologies was assessed by the bootstrap method with 1000 replicates.

Quantitative DNA-DNA hybridisation. Labelling of DNA probes with tritium-labelled nucleotides was performed by the random primed method (Megaprime labelling kit, Amersham) and hybridisation was carried out at 60°C by the S1-nuclease method (Crosa et al. 1973, Grimont et al. 1980) with adsorption of S1-resistant onto DE81 filters (Whatman).

Experimental infection. Bacteria were grown at 20°C for 36 h in marine broth (Diagnostic Pasteur) and harvested in autoclaved (121°C/15 min) seawater at a concentration of 8×10^8 CFU ml⁻¹ evaluated by spectrophotometer (Eppendorf) at 600 nm. This bacterial concentration was accurately determined by enumeration on marine agar plates using a conventional dilution plating technique with incubation at 20°C for 2 d (not shown).

Intrapalleal injection: Oyster spat originated from natural beds, measured 4 to 6 cm and were 12 to 18 mo old. The shell was filed away on the dorsal side to form a gap between the valves. The conditions tested were

strains 31, 32 or 31+32 in triplicate. A volume of 50 µl of the bacterial suspension (i.e. 4×10^7 CFU) was injected into the pallial cavity. Negative controls consisted of groups of 30 oysters injected with sterile seawater (SSW). After injection, oysters were held out of water overnight at 20°C. They were then transferred to aquaria (30 oysters per 2.5 l aquarium) containing aerated 5 µm-filtered seawater at 20°C, kept under static conditions and fed daily with a mixture of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans*. Mortality was recorded daily. The water was changed once a week.

Bath exposure: The oyster spat used originated from the IFREMER nursery (La Tremblade, France), measured 1 to 2 cm and were 4 mo old. The conditions tested SSW, strain 47 (strain of lower virulence and phylogenetically related to *Vibrio splendidus*), 31, 32 or 31+32 in triplicate. One hundred juvenile oysters were kept overnight in 400 ml of bacterial suspension (10^7 CFU ml⁻¹) in aerated 5 µm-filtered seawater supplemented with a mixture of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans*. Two litres of 5 µm-filtered seawater were then added per aquarium. Oysters were kept as described above. The water was changed once a week.

Intramuscular injection: Oysters were intramuscularly injected with bacterial strains as described by Gay et al. (2004). Conditions were SSW, 47, 31, 32 and 31+32.

Histology and electron microscopic examination. As soon as mortality was observed in the individuals

experimentally challenged by injection in the adductor muscle, moribund and live oysters in all conditions were fixed in Davidson's or Carson's fixative (Renault & Cochenec 1995). For oysters injected in the pallial cavity, individuals were fixed in Davidson's fixative as soon as they displayed a weakness of the adductor muscle. Individuals in Davidson's fixative were prepared according to Renault & Cochenec (1995). Slides were stained with haematoxylin and eosin. Slides were examined on an Olympus BX50 optical microscope.

Small pieces of tissue (3 to 4 mm) from individuals fixed in Carson's fixative were processed for transmission electron microscopy according to Renault & Cochenec (1995). Ultrathin sections were then examined in a JEOL JEM 1200EX electron microscope at 80 kV.

RESULTS

Taxonomic characterisation

Following phenotypic analysis and numerical taxonomy, based on 80 biochemical tests, strains 31 and 32 displayed more than 80% similarity with type strains belonging to *Vibrio splendidus* polyphyletic group i.e. *V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis*, *V. lentus*, *V. chagasii* and *V. splendidus*. Table 1 sums up the discriminant tests between strains 31 and 32 and the *V. splendidus*-related type strains.

Table 1. Biochemical characteristics of 31, 32 and type strains belonging to *Vibrio splendidus* polyphyletic group. Only the 20 discriminant tests are given

	31	32	<i>V. kanaloae</i> LMG 20539 ^T	<i>V. tasmaniensis</i> LMG20012 ^T	<i>V. pomeroyi</i> LMG20537 ^T	<i>V. chagasii</i> LMG 21353 ^T	<i>V. splendidus</i> LMG 4042 ^T	<i>V. lentus</i> CIP 107166 ^T
ADH	+	+	+	-	+	+	-	-
β-galactosidase	-	-	+	-	+	-	+	+
NO ₂ production	-	+	-	+	-	-	-	-
Gelatinase	-	+	+	-	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	-	+	+
TDA	-	-	+	-	+	+	-	-
Acid from								
Mannitol	+	-	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	-	+	-	-	+	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	+	-
Amygdaline	+	+	+	-	+	-	+	-
Glycerol	+	+	+	-	-	-	+	-
Galactose	-	-	+	-	+	-	+	-
Esculine	-	+	+	+	+	+	+	-
Mannose	+	+	+	+	+	-	+	+
Glycogene	+	+	+	-	+	+	+	+
Amidon	+	+	+	-	+	+	+	-
Growth								
4°C	+	+	+	-	+	-	+	-
35°C	-	-	+	-	-	-	+	-
40°C	-	-	+	-	-	-	-	-
6% NaCl	-	-	+	+	+	+	-	-

Phylogenetic analysis of *Vibrio splendidus* related strains was carried out by comparison of the nucleotide sequences (1200 bp) of the small subunit ribosomal RNA genes (16S rDNA, Fig. 1) and gyrase B subunit (*gyrB*) genes. In the 16S rDNA tree, clustering of strain 31, 32 and *V. lentus*, *V. splendidus*, *V. tasmaniensis* type strains was supported by a bootstrap value of 95%. In the *gyrB* tree, the same clustering as formerly described (Gay et al. 2004) was obtained despite a longer sequence analysed (1200 bp instead of 588). Strain 32 was separated from a cluster containing strain 31, *V. kanaloae*, *V. tasmaniensis* and *V. pomeroyi* type strains with a bootstrap value of 100%.

DNA-DNA hybridisation was performed with DNA of strains 31, 32, LMG 20539^T (*V. kanaloae*), LMG 20537^T (*V. pomeroyi*), CIP 107166^T (*V. lentus*), LMG 4042^T (*V. splendidus*), LMG 21359^T (*V. cyclitrophicus*) as targets and 31 or 32 DNA as probes (Table 2). Rates of hybridisation ranged between 40% (31-*V. cyclitrophicus*) and 92% (31-*V. kanaloae*). Both strain 31 and strain 32 probes hybridised at more than 70% with *V. kanaloae* (92 and 87%, respectively) and with *V. pomeroyi* (72 and 76%, respectively).

Experimental infection

Intrapalleal injection. When strains were injected in the palleal cavity mortality began 7 d post injection. The mean highest mortality rate at 21 d post injection was induced by 31+32 (36%), followed by 31 (29.5%), then 32 (19.2%) and SSW (18.6%).

Bath exposure. At 30 d post exposure to SSW, suspensions of 47, 31, 32 or 31+32, no mortality had occurred.

Histology and electron microscopy examination

Oysters were histologically analysed after injection of SSW, strain 47, 31, 32, or 31+32 in the adductor muscle (Gay et al. 2004) or after injection of SSW, 31, 32, or 31+32 in the palleal cavity. After the injection in the adductor muscle, some live oysters were sampled as soon as mortality began i.e. 24 h. Beginning at 1 wk after the injection in the palleal cavity, oysters showing signs of weakness of the adductor muscle were sampled daily. For both types of inoculation, bacterial localisations and induced alterations were similar.

Bacterial localisation. Oysters injected with 47 showed scarce bacteria in the adductor muscle; these were located between the muscular fibres. In oysters injected with 31, 32, or 31+32, bacteria were localised in foci either between muscular fibres at the periphery of

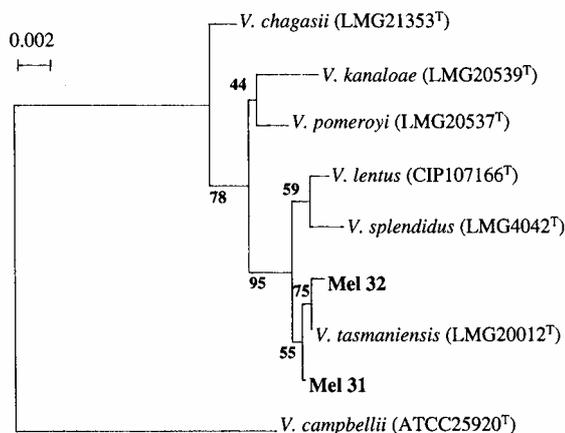


Fig. 1. Phylogenetic tree of partial 16S rDNA. The *Vibrio campbellii* homologue was used as outgroup. 1200 gap-free sites were compared. Horizontal branch lengths are proportional to evolutionary divergence. Bootstrap values (percent of 1000 replicates) appear next to the corresponding branch

the adductor muscle (Fig. 2a) or in the connective tissue surrounding this organ (Fig. 2b). Some foci were also observed in the kidney close to the injected muscle, whereas no foci were observed in mantle, gills, or digestive gland. Transmission electron microscopy of pieces of the adductor muscle led to the observation of bacterial foci in the connective tissue between muscular fibres (Fig. 3).

Tissular and cellular alterations. After injection of SSW (Fig. 4a) or 47, all the organs appeared unaltered, except in the case of a few individuals injected with 47, which showed slight and localised alterations of the adductor muscle.

Following the injection of 31 and/or 32, the most altered organ was the translucent part of the adductor muscle, whereas the crescent shaped white part did not generally display any lesion. The other organs were undamaged, except for some individuals displaying localised infiltration in the gills and connective tissues.

Table 2. Intraspecific DNA-DNA homology among strains 31 and 32 and type strain belonging to *Vibrio splendidus* polyphyletic group

	31	32
31	100	81
32	79	100
<i>V. kanaloae</i> (LMG 20539 ^T)	92	87
<i>V. pomeroyi</i> (LMG 20537 ^T)	72	76
<i>V. lentus</i> (CIP 107166 ^T)	64	63
<i>V. splendidus</i> (LMG 4042 ^T)	56	62
<i>V. cyclitrophicus</i> (LMG 21359 ^T)	40	53

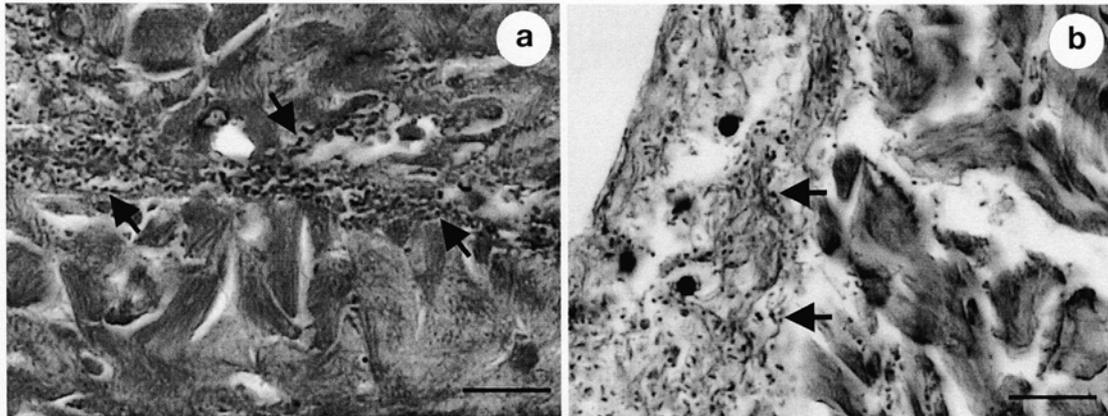


Fig. 2. *Crassostrea gigas*. Localisation of the bacteria (arrows) after experimental infection by injection in the adductor muscle. (a) Between muscular fibres at the periphery of the adductor muscle, (b) in the connective tissue surrounding the adductor muscle. HE staining, scale bars = 10 µm

Muscle of individuals injected with SSW displayed a homogeneous structure where muscle fibres formed dense bands surrounded by connective tissue (Fig. 4a). In cross sections, bands appeared as separate packed units (Fig. 4a). Haemocytes were usually present between the fibres and in the connective tissue. Muscle fibres were long cylindrical cells including an oval shaped nucleus near the cell surface, and a homogenous cytoplasm. In individuals injected with strains 31 and/or 32, the translucent part of the adductor muscle displayed several kinds of lesions (Fig. 4b–d). The first type of alteration was characterised by the presence of peculiar muscle cells, arbitrarily distributed throughout the organ. These cells were oval or round and contained non-homogenous granular material surrounded by a translucent halo (Fig. 4b). These structures were interpreted as degenerating cells. The second type of alteration affected entire muscle bands. Granular and non-homogenous material was observed in the muscle cells as in the first type of alteration. Most of the damaged cells were of an unmodified shape, except for a few round cells, as in the first kind of alteration (Fig. 4c). Whole damaged muscle bands displayed a general swelling of the cells (rounded or not) as observed when Fig. 4b,c were compared. This type of lesion was more extensive than before but still quite localised. The third type of alteration usually affected wide muscle areas. Muscle fibres appeared extremely condensed and associated with large clear gaps (Fig. 4d).

Even though some cells appeared as degenerating, these 3 types of lesions were not associated with any noticeable infiltration of haemocytes (Fig. 4b–d). Nevertheless, rare individuals displayed massive infiltrations where large areas of the adductor muscle were infiltrated by haemocytes with some condensed muscular fibres in between (Fig. 5).

Transmission electron microscopy (Fig. 6) confirmed the lesions observed in light microscopy. Healthy and damaged muscular fibres were seemingly arbitrarily distributed throughout the adductor muscle. Whereas the cytoplasmic content of these damaged cells was severely degenerating, an apparently intact cytoplasm

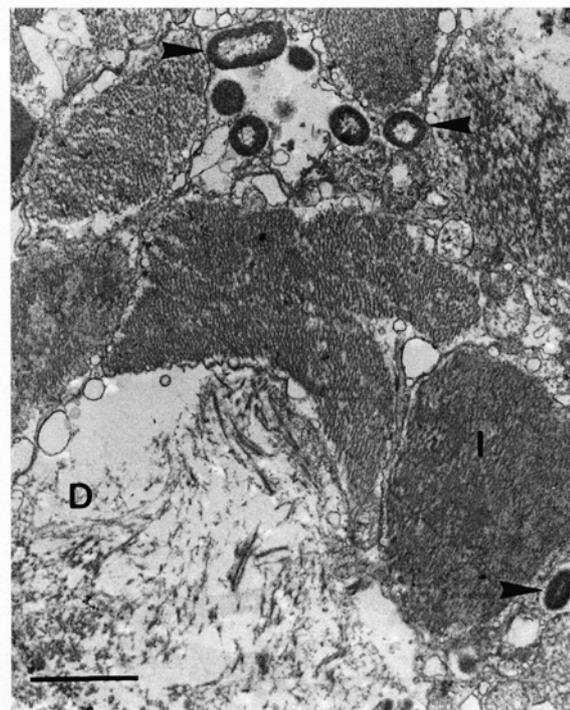


Fig. 3. *Crassostrea gigas*. Localisation of the bacteria (arrowheads) after experimental infection by injection in the adductor muscle. I: intact muscle fibres, D: degenerating muscle fibres. TEM, scale bar = 2 µm

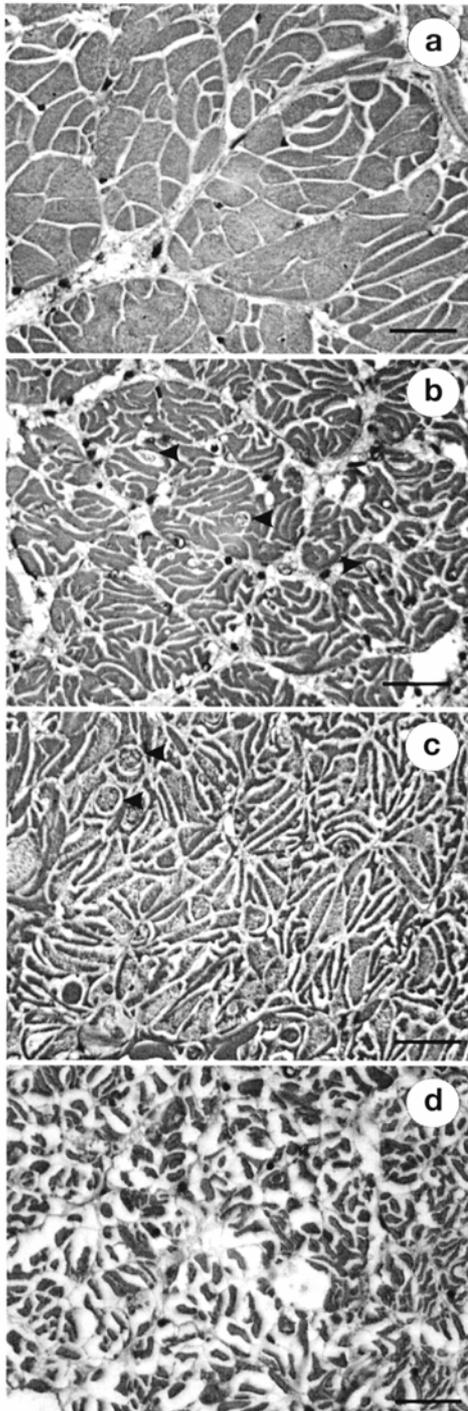


Fig. 4. *Crassostrea gigas*. Adductor muscle following the injection of (a) sterile seawater, (b-d) 31+32 into the adductor muscle. (b) Granular and non-homogenous round structures (arrowheads); (c) entire muscle bands altered with some rounded cells (arrowheads); (d) condensed muscle fibres and clear gaps in between. HE staining, scale bars = 20 μ m

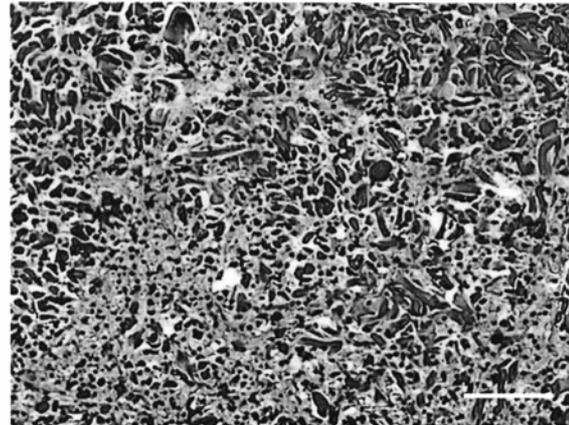


Fig. 5. *Crassostrea gigas*. Intense infiltration following injection in the adductor muscle. HE staining, scale bar = 50 μ m

mic membrane was observed surrounding these structures, which could be interpreted as the endomysium (Fig. 6). Some apparently intact mitochondria and clear vacuoles were also observed within these degenerating cells (not shown). The myofibril density decrease induced by the degeneration of myofibrils observed in transmission electron microscopy could be the counterpart of the granular structures of the first and second types of alteration observed in light microscopy.

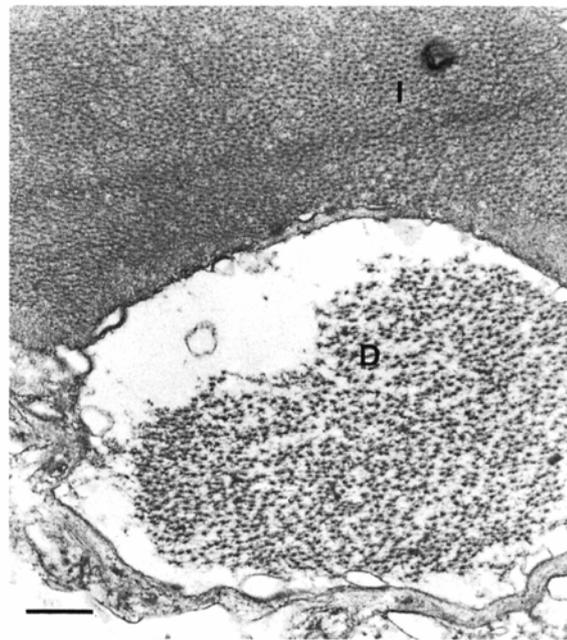


Fig. 6. *Crassostrea gigas*. Myofibril alterations following the injection of 31+32 into the adductor muscle. I: intact muscle fibres, D: degenerating muscle fibres. TEM, scale bar = 500 nm

DISCUSSION

In a former study (Gay et al. 2004), strains 31 and 32 were selected as a model because they were related to *Vibrio splendidus*, a group previously associated with several mollusc and fish mortality events. They illustrate the collaborative effect observed for different strains that will allow us to analyse the shared and/or different mechanisms of virulence implicated in this agonistic action.

The relationships between strains 31 and 32 and the other *Vibrio splendidus* related new species were evaluated using a polyphasic approach. Neither classical biochemical tests or phylogenetic study based on 16S rDNA or *gyrB* led to a clusterisation of these strains with a unique species. DNA-DNA hybridisation recognised as the reference method for bacterial systematics (Grimont 1984), led us to define 31 and 32 as belonging to the polyphyletic group *V. splendidus* without clear discrimination between *V. kanaloae* and *V. pomeroyi*. These results could be due either to a lack of discriminatory power of the molecular methods used or to an intermediate position of our strains between the 2 species. Experiments are in progress to develop new phylogenetic analyses using a multilocus scheme.

Putative pathogenic bacteria for *Crassostrea gigas* had been selected by injection of bacterial suspension in the adductor muscle (Lacoste et al. 2001, Le Roux et al. 2002). The results are obtained quickly using this technique since mortality appears as soon as 24 h post injection; however, drawbacks, such as disruption of tissues and variability, were observed. Less invasive methods were tested and the mortality induced was described. The injection in the pallear cavity is an alternative since it allows the transmission of the disease without disrupting the tissues. However, this method does not accurately reflect natural infection due to the artificial crossing of the mechanical barrier (shell and mantle) and the stress induced by a long period of time under static conditions. This method did, however, confirm the collaboration between 31 and 32, and histopathology demonstrated that bacteria localisation and induced lesions were similar following intrapalleal or intramuscular inoculation.

Bath exposure did not induce any mortality. However, this is quite often encountered among pathogens of aquatic animals. Li et al. (1998) failed to infect abalone *Haliotis discus hannai* Ino with virulent *Vibrio fluvialis* by bath exposure, whereas abalone infected through foot lesions developed the bacterial disease. Experimental infection of Atlantic salmon *Salmo salar* by *V. salmonicida* and *Aeromonas salmonicida* led to higher reproducible results following intraperitoneal injection compared to cohabitation or bath exposure (Nordmo & Ramstad 1999). Since bath exposure of

Crassostrea gigas with *V. splendidus* did not lead to any mortality, Lacoste et al. (2001) suggested that *V. splendidus* was transmitted vertically; however, other hypotheses may be proposed for these negative results and for the variability sometimes observed in the different inoculation methods. First, as for the bacteria, culture media or environmental conditions may modulate the expression of virulence factors (Ottaviani et al. 2001), or subcultures may lead to a loss of virulence. Second, as for the oyster, animals may have suffered mortality or stress prior to the experimental infection, or a particular status of the host (genetic and/or physiologic) may be necessary for initiation of pathogenesis and/or susceptibility of the host. For instance, maturation may induce an increased susceptibility to infection. This hypothesis is supported by the knowledge that the gametogenesis is a period of negative energy budget (Soletchnik et al. 1997) where most of the acquired energy is used for the production of gametes to the detriment of the defence mechanisms (Perdue et al. 1981, Myrand et al. 2000). Experiments are in progress to evaluate the role of environmental and host factors in the pathogenesis of disease due to *V. splendidus* related strains.

Host alterations following experimental infection after bacterial inoculation are reported. The only macroscopic sign preceding oyster death was a weakness of the adductor muscle. No alteration or organic deposit was observed on the shell of infected animals, although such macroscopic signs have been previously described following *Vibrio splendidus* infection (Lambert et al. 1999). In oysters injected with 47, few bacteria were observed, suggesting that this strain had been cleared shortly after the injection in contrast to 31 and/or 32 (Kelly & Dinuzzo 1985, Lopez-Cortes et al. 1999). In oysters injected with 31, 32 or 31+32, bacteria were always localised either between muscular fibres at the periphery of the adductor muscle or in the connective tissue surrounding this organ or in the part of the kidney running along the adductor muscle. However, the whole adductor muscle was severely damaged, which is in contrast with the localisation of bacteria only at the periphery of this organ. Based on the literature, several hypotheses may be suggested. Bacteria may produce toxins without the bacteria themselves being present at the altered site. In the withering syndrome of abalone, Rickettsiales-like prokaryotes are localised in gastrointestinal epithelium cells and induce digestive gland degeneration and foot muscle atrophy (Moore et al. 2001, Friedman et al. 2002). Bacterial density may be too low to be detected. In borreliosis, few spirochetes are observed in tissues (Cadavid et al. 2000). The lesions may also be due to the host response which is at first beneficial to help fight the disease but may induce an imbalance resulting in

wasting, as in some cases of sepsis (Sharma & Anker 2002). Pathogenic bacteria induce a dysfunction of some host proteinases resulting in the lysis of myofibrillar proteins (Hatzizisis et al. 2000, Saouda et al. 2001, Sun et al. 2003). A direct action of the bacteria on other tissue such as the nervous or the vasculatory system may induce muscular lesions as consequences. In the clostridial myonecrosis, bacteria induce a reduction of arteriolar flow impairing oxygen delivery and anoxic necrosis (Dastur & Daver 1980, Stevens 2000). Finally, bacteria may have invaded and damaged the whole muscle and then migrated to other tissues during the time preceding the sampling of individuals for histological examination. Specific molecular tools (*in situ* hybridisation and GFP-expressing bacteria) are being developed to describe the infection route and eventual specific localisation and migrations of both strains.

Muscular lesions were not due to the inoculation method since they were also observed following bacterial injection into the palleal cavity. The observed lesions indicated a degeneration of the adductor muscle, which may explain the weakness of the oysters after experimental infection. The rounded granular structures described in the first type of alterations could have been bacteria globi as described by Lancaster et al. (1983) for *Mycobacterium leprae*. However, following Feulgen staining, these structures were found to be Feulgen negative, thus containing no DNA (not shown). The granular structures of the first and second types of alterations may be due to a large decrease in the myofibril density as observed in transmission electron microscopy. The membrane of the damaged muscular fibres seems to be intact, suggesting a phenomenon other than necrosis, where the first step is membrane disruption leading to influx of water and ions and thus to cell swelling and lysis. Cell alterations observed in the present work have been previously described in the literature, sometimes with only one of them (Abella et al. 2003) or both, then called coagulative necrosis, without any further descriptions of the mechanisms induced (Eldar et al. 1999). The 3 types of alterations may be interpreted as a succession of events: first a few muscular fibres were damaged, then the larger part of the adductor muscle displayed granular degenerating muscular fibres and finally, large parts of the organ contained very condensed muscular fibres.

Muscle alteration is one of the signs described in fish and mollusc vibriosis (McCarthy 1976, Bruno et al. 1986, Egidius 1987, Li et al. 1998). Furthermore, other pathogens were described as inducing muscular lesions in marine animals. For instance, the akoya-virus infection in the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii* induced necrosis, atrophy, swelling and vacuolisation of the muscle fibres of the adductor, foot, and pallial muscles (Miyazaki et al. 1999, Miyazaki et

al. 2000). Co-infection of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* by the yeast *Metschnikowia bicuspidata* and the bacteria *Enterococcus faecium* led to important edema and liquefactive necrosis in abdominal, pereopod and pleopod muscles (Chen et al. 2003). In several other bacterial models, muscular lesions seem to be either secondary lesions (Schaible et al. 1989, Ling et al. 2000) or consequences of an action of the pathogenic bacteria on other organs (Hund 2001), whereas in the 31+32 infection model, no other organ appeared damaged.

A few individuals displayed massive infiltrations in the adductor muscle. However, it is noticeable that the vast majority of individuals displayed no infiltration associated with muscular lesions or degenerating cells, whereas inflammation is often observed at the site of infection either to fight against the infectious agent or to repair the damaged tissue (Miyazaki et al. 1999, Neely et al. 2002). Some mollusc pathogens were described as inducing large increases in the circulating haemocytes densities (Oubella et al. 1993) and others were demonstrated to possess chemoattractants for oyster haemocytes (Cheng & Howland 1979, Howland & Cheng 1982). The absence of inflammatory response may be due to different factors. Some bacterial pathogens mimic host structures to avoid this response (Moran et al. 1996), whereas others seem to produce toxins preventing inflammatory response (O'Brien & Melville 2000). The presence of intense inflammation was only observed in some individuals and associated with condensed cells of the third type of alteration. Considering that condensed cells constitute the final stage of the disease, a final role of the infiltration to clear cell debris and to heal the organ instead of an action of the pathogenic bacteria may be hypothesised (Ford et al. 1993). Experiments will be conducted with various sampling times in order to describe disease development.

The present study made it possible to describe bacterial localisation and muscular alterations following injection in the palleal cavity or in the adductor muscle of strains 31 and/or 32. However, no major difference was observed in light microscopy irrespective of whether the strains were inoculated individually or together. Thus, the strain specific virulence apparently does not induce differential structural changes in altered cells. Other approaches will be tested based on phenotypic features (production of toxic extracellular products) and on genomics (genomic subtraction).

Acknowledgements. The authors acknowledge Mr. Giraudeau for providing oysters and Prof. C. Tinsley for critically reading the manuscript. This study was carried out with financial assistance from the EU Community Reference Laboratory and the Région Poitou-Charentes.

LITERATURE CITED

- Abella BS, Kuchinic P, Hiraoka T, Howes DS (2003) A traumatic clostridial myonecrosis: case report and literature review. *J Emerg Med* 24(4):401–405
- Baticados MCL, Lavilla-Pitogo CR, De Cruz-Lacierda ER, la Pena LD, Junaz NA (1990) Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Dis Aquat Org* 9:133–139
- Baumann P, Schubert RHW (1984) Family II *Vibrionaceae* Veron 1965, 5245^{AL}. In: Krieg NR, Holt JG (eds) *Bergey's manual systematic of bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, p 516–517
- Baumann P, Baumann L, Bang SS, Woolkalis MJ (1980) Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckeia*, and *Photobacterium*: abolition of the genus *Beneckeia*. *Curr Microbiol* 4:127–132
- Bruno DW, Hastings TS, Ellis AE (1986) Histopathology, bacteriology and experimental transmission of cold-water vibriosis in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis Aquat Org* 1: 163–168
- Cadavid D, O'Neill T, Schaefer H, Pachner AR (2000) Localization of *Borrelia burgdorferi* in the nervous system and other organs in a nonhuman primate model of Lyme disease. *Lab Invest* 80(7):1043–1054
- Castro D, Pujalte MJ, Lopez-Cortes L, Garay E, Borrego JJ (1992) *Vibrio* isolated from the cultured Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): numerical taxonomy and antibacterial activities. *J Appl Microbiol* 93:438–447
- Chen SC, Chen TH, Wang PC, Chen YC, Huang JP, Lin YD, Chung HC, Liaw LL (2003) *Metschnikowia bicuspidata* and *Enterococcus faecium* co-infection in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis Aquat Org* 55(2):161–167
- Cheng TC, Howland KH (1979) Chemotactic attraction between haemocytes of the oyster, *Crassostrea virginica*, and bacteria. *J Invertebr Pathol* 33:204–210
- Crosa JH, Brenner DJ, Falkow S (1973) Use of a single-strand specific nuclease for analysis of bacterial and plasmid deoxyribonucleic acid homo- and heteroduplexes. *J Bacteriol* 115:904–911
- Dastur DK, Daver SM (1980) Striated muscle in four categories of leprosy. II. Fine structural changes. *Int J Leprosy* 48(2):149–158
- Egidius E (1987) Vibriosis: pathogenicity and pathology. A review. *Aquaculture* 67:15–28
- Eldar A, Perl S, Frelief PF, Bercovier H (1999) Red drum *Sciaenops ocellatus* mortalities associated with *Streptococcus iniae* infection. *Dis Aquat Org* 36(2):121–127
- Farto R, Montes M, Perez MJ, Nieto TP, Larsen JL, Pedersen K (1999) Characterization by numerical taxonomy and ribotyping of *Vibrio splendidus* biovar I and *Vibrio scophthalmi* strains associated with turbot cultures. *J Appl Microbiol* 86:796–804
- Farto R, Armada SP, Montes M, Guisande JA, Perez MJ, Nieto TP (2003) *Vibrio lentus* associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*). *J Invertebr Pathol* 83: 149–156
- Ford SE, Kanaley SA, Littlewood DT (1993) Cellular responses of oysters infected with *Haplosporidium nelsoni*: changes in circulating and tissue-infiltrating haemocytes. *J Invertebr Pathol* 61:49–57
- Friedman CS, Biggs W, Shields JD, Hedrick RP (2002) Transmission of withering syndrome in black abalone, *Haliotis cracherodii* leach. *J Shellfish Res* 21(2):817–824
- Galtier N, Gouy M, Gautier C (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* 12: 543–548
- Gascuel O (1997) BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol Biol Evol* 14:685–695
- Gatesoupe FJ, Lambert C, Nicolas JL (1999) Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *J Appl Microbiol* 87:757–763
- Gay M, Berthe FCJ, Le Roux F (2004) Screening of *Vibrio* isolates towards the development of an experimental infection model in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Dis Aquat Org* 59:49–56
- Grimont PAD (1984) Use of DNA reassociation in bacterial classification. *Can J Microbiol* 34:541–546
- Grimont PAD, Popoff MY, Grimont F, Coynault C, Lemelin M (1980) Reproducibility and correlation study of three deoxyribonucleic acid hybridisation procedure. *Curr Microbiol* 4:325–330
- Hatzizisis D, Gaitanaki C, Beis I (2000) Degradation of myofibrillar proteins by a calpain-like proteinase in the arm muscle of *Octopus vulgaris*. *J Comp Physiol [B]* 170(5-6): 447–456
- Howland KH, Cheng TC (1982) Identification of bacterial chemoattractants for oyster (*Crassostrea virginica*) haemocytes. *J Invertebr Pathol* 39:123–132
- Hund E (2001) Neurological complications of sepsis: critical illness polyneuropathy and myopathy. *J Neurol* 248(11): 929–934
- Kelly MT, Dinuzzo A (1985) Uptake and clearance of *Vibrio vulnificus* from Gulf coast oysters (*Crassostrea virginica*). *Appl Environ Microbiol* 50(6):1548–1549
- Lacoste A, Jalabert F, Malham S, Cuffe A, Gélébart F, Cordevant C, Lange M, Poulet SA (2001) A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis Aquat Org* 46:139–145
- Lambert C, Nicolas JL, Cilia V (1999) *Vibrio splendidus*-related strain isolated from brown deposit in scallop (*Pecten maximus*) cultured in Brittany (France). *Bull Eur Asn Fish P* 19:102–106
- Lancaster RD, Hilson GR, McDougall AC, Colston MJ (1983) *Mycobacterium leprae* infection in nude mice: bacteriological and histological responses to primary infection and large inocula. *Infect Immun* 39(2):865–872
- Le Roux F, Gay M, Lambert C, Waechter M, Poubalanne S, Chollet B, Nicolas JL, Berthe F (2002) Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquat Living Resour* 15:251–258
- Le Roux F, Gay M, Lambert C, Nicolas JL, Gouy M, Berthe FCJ (2004) Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus* related strains based on *gyrB* gene sequences. *Dis Aquat Org* 58:143–150
- Li T, Ding M, Zhang J, Xiang J, Liu R (1998) Studies on the pustule disease of abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) on the Dalian coast. *J Shellfish Res* 17:707–711
- Ling SH, Wang XH, Xie L, Lim TM, Leung KY (2000) Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* in *in vivo* and *in vitro* fish models. *Microbiology* 146(1):7–19
- Lopez-Cortes L, Castro D, Navas JI, Borrego JJ (1999) Phagocytic and chemotactic responses of Manila and carpet shell clam haemocytes against *Vibrio tapetis*, the causative agent of brown ring disease. *Fish Shellfish Immun* 9(7): 543–555
- Macian MC, Ludwig W, Aznar R, Grimont PA, Schleifer KH,

- Garay E, Pujalte MJ (2001) *Vibrio lentus* sp. nov., isolated from Mediterranean oysters. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 1449–1456
- Martin Y, Bonnefont JL, Chancerelle L (2002) Gorgonians mass mortality during the 1999 late summer in French Mediterranean coastal waters: the bacterial hypothesis. *Water Res* 36:779–782
- McCarthy DH (1976) *Vibrio* disease in eels. *J Fish Biol* 8: 317–320
- Miyazaki T, Goto K, Kobayashi T, Kageyama T, Miyata M (1999) Mass mortalities associated with a virus disease in Japanese pearl oysters *Pinctada fucata martensii*. *Dis Aquat Org* 37(1):1–12
- Miyazaki T, Nozawa N, Kobayashi T (2000) Clinical trial results on the use of a recombinant feline interferon-omega to protect Japanese pearl oysters *Pinctada fucata martensii* from akoya-virus infection. *Dis Aquat Org* 43(1): 15–26
- Moore JD, Cherr GN, Friedman CS (2001) Detection of 'Candidatus *Xenohaliotis californiensis*' (Rickettsiales-like prokaryote) inclusions in tissue squashes of abalone (*Haliotis* spp.) gastrointestinal epithelium using a nucleic acid fluorochrome. *Dis Aquat Org* 46(2):147–152
- Moran AP, Prendergast MM, Appelmek BJ (1996) Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease. *FEMS Immunol Med Microbiol* 16(2):105–115
- Myhr E, Larsen JL, Lillehaug A, Gudding R, Heum M, Hastein T (1991) Characterization of *Vibrio anguillarum* and closely related species isolated from farmed fish in Norway. *Appl Environ Microb* 57:2750–2757
- Myrand B, Guderley H, Himmelman JH (2000) Reproduction and summer mortality of blue mussels *Mytilus edulis* in the Magdalene Islands, Southern Gulf of St. Lawrence. *Mar Ecol Prog Ser* 197:193–207
- Nealson KH, Wimpee B, Wimpee C (1993) Identification of *Vibrio splendidus* as a member of the planktonic luminous bacteria from Persian Gulf and Kuwait region with LuxA probes. *Appl Environ Microb* 59:2684–2689
- Neely MN, Pfeifer JD, Caparon M (2002) *Streptococcus*-zebrafish model of bacterial pathogenesis. *Infect Immun* 70(7):3904–3914
- Nicolas JL, Corre S, Gauthier G, Robert R, Ansquer D (1996) Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis Aquat Org* 27:67–76
- Nordmo R, Ramstad A (1999) Variables affecting the challenge pressure of *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio salmonicida* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 171:1–12
- O'Brien DK, Melville SB (2000) The anaerobic pathogen *Clostridium perfringens* can escape the phagosome of macrophages under aerobic conditions. *Cell Microbiol* 2(6):505–519
- Ottaviani D, Bacchiocchi I, Masini L, Carraturo A, Russo GL, Giammaroli M, Sbaraglia G (2001) Correlation between medium acidification and pathogenicity in environmental halophilic non-cholera vibrios. *Lett Appl Microbiol* 33: 61–64
- Oubella R, Maes P, Paillard C, Auffret M (1993) Experimentally induced variation in haemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Dis Aquat Org* 15:193–197
- Paillard C, Maes P (1990) Etiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum*: pathogénicité d'un *Vibrio* sp. *CR Acad Sci Paris* 310:15–20
- Perdue JA, Beattie JH, Chew KK (1981) Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster *C. gigas* in the Washington state. *J Shellfish Res* 1:9–16
- Renault T, Cochenec N (1995) *Chlamydia*-like organisms in ctenidia and mantle cells of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. *Dis Aquat Org* 23(2):153–159
- Saouda M, Wu W, Conran P, Boyle MD (2001) Streptococcal pyrogenic exotoxin B enhances tissue damage initiated by other *Streptococcus pyogenes* products. *J Infect Dis* 184(6):723–731
- Schaible UE, Kramer MD, Justus CW, Museteanu C, Simon MM (1989) Demonstration of antigen-specific T cells and histopathological alterations in mice experimentally inoculated with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 57(1): 41–47
- Sharma R, Anker SD (2002) Cytokines, apoptosis and cachexia: the potential for TNF antagonism. *Int J Cardiol* 85(1): 161–171
- Soletchnik P, Razet D, Geairon P, Faury N, Goulletquer P (1997) Ecophysiologie de la maturation sexuelle et de la ponte de l'huître creuse *C. gigas*: réponses métaboliques (respiration) et alimentaires (filtration, absorption) en fonction des différents stades de maturation. *Aquat Living Resour* 10:177–185
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PAD and 9 others (2002) Report of the Ad Hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microb* 52:1043–1047
- Stevens DL (2000) The pathogenesis of clostridial myonecrosis. *Int J Med Microbiol* 290(4-5):497–502
- Sugumar G, Nakai T, Hirata Y, Matsubara D, Muroga K (1998) *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis Aquat Org* 33:111–118
- Sun X, Mammen JM, Tian X (2003) Sepsis induces the transcription of the glucocorticoid receptor in skeletal muscle cells. *Clin Sci* 105(3):383–391
- Thompson FL, Hoste B, Vandemeulebroecke K, Swings J (2001) Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Syst Appl Microbiol* 24: 520–538
- Thompson FL, Thompson CC, Li Y, Gomez-Gil B, Vandenberghe J, Hoste B, Swings J (2003a) *Vibrio kanaloae* sp. nov., *Vibrio pomeroyi* sp. nov. and *Vibrio chagasii* sp. nov., from sea water and marine animals. *Int J Syst Evol Microb* 53:753–759
- Thompson FL, Thompson CC, Swings J (2003b) *Vibrio tasmaniensis* sp. nov., isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Syst Appl Microbiol* 26:65–69
- Waechter M, Le Roux F, Nicolas JL, Marissal E, Berthe F (2002) Characterisation of *Crassostrea gigas* spat pathogenic bacteria. *CR Biologies* 325:231–238

Editorial responsibility: David Bruno,
Aberdeen, UK

Submitted: January 30, 2004; Accepted: June 7, 2004
Proofs received from author(s): ♦

11.4 - Interactions bactéries/hémocytes

De nombreux auteurs ont observé des interactions entre des bactéries pathogènes et les hémocytes de mollusques lors d'expérimentations *in vitro* et/ou *in vivo* (Howland & Cheng, 1982 ; Oubella et al., 1993 ; Oubella et al., 1994 ; Lambert & Nicolas, 1998 ; Genthner et al., 1999 ; Lopez-Cortes et al., 1999 ; Lane & Birkbeck, 2000 ; Allam et al., 2002 ; Choquet et al., 2003).

Afin d'évaluer l'effet des souches pathogènes 31 et 32 sur les hémocytes de *C. gigas*, des hémocytes d'huîtres saines sont mis en contact *in vitro* avec de l'EDMAS ou des suspensions bactériennes (souches 125 [*V. mediterranei*, témoin négatif], 31, 32 ou le couple 31+32) au cours de quatre expérimentations réalisées en triplicats. Les hémocytes sont donc soumis à 5 conditions nommées EDMAS, 125, 31, 32 et 31+32. Les graphiques ci-après représentent les moyennes des résultats des 4 expérimentations et la moyenne de ces valeurs. Des analyses de variance avec le logiciel Statgraphics, version 5.1, sont effectuées sur les résultats obtenus.

11.4.1 - Paramètres morphologiques des cellules

Suite à l'incubation des hémocytes avec 31, 32 ou 31+32, une partie des cellules présente une augmentation de complexité. Afin de quantifier ce phénomène, nous avons arbitrairement défini, sur les cytogrammes représentant en abscisse la taille des cellules et en ordonnée leur complexité, une population contenant ces cellules et nommée population "C" (Figure 8). Elle est composée de cellules de plus grande complexité mais de taille inchangée par rapport au reste de la population. Le pourcentage moyen de cellules appartenant à cette population est de 13,3 % en EDMAS ; 11,2 % en présence de la souche 125 ; 29,4 % en présence de la souche 31 ; 28,4 % en présence de la souche 32 et 28,8 % en présence du couple 31+32 (Figure 9). Les pourcentages de la population "C" en présence des souches 31, 32 et 31+32 sont significativement différents de ceux observés en présence d'EDMAS et de la souche 125 ($p < 0,05$). Les différences entre 31 et 32 sont significatives ($p < 0,05$), en revanche, les différences entre 31 et 31+32 et entre 32 et 31+32 ne le sont pas ($p > 0,05$). L'analyse de variance du pourcentage de cellules de la population "C" montre que l'interaction entre les expérimentations et les conditions n'explique que 3,3 % de la variance des résultats, alors que les conditions et les expérimentations en expliquent respectivement 80,1 et 13,9 % (Tableau 6).

La présence de bactéries pathogènes (31, 32 ou 31+32) entraîne donc une modification structurale d'une partie des hémocytes, la variabilité des résultats obtenus étant due, pour plus de 80 %, aux différentes conditions testées.

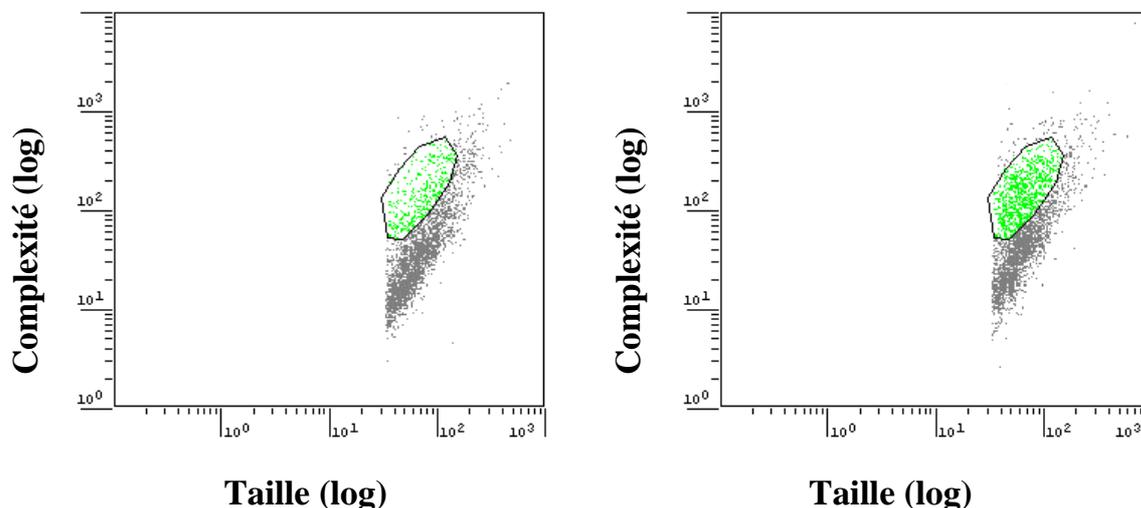


Figure 8. Population "C" (zone verte) sur un cytogramme taille/complexité suite à un contact des hémocytes avec la souche 125 (a) ou avec les souches 31+32 (b).

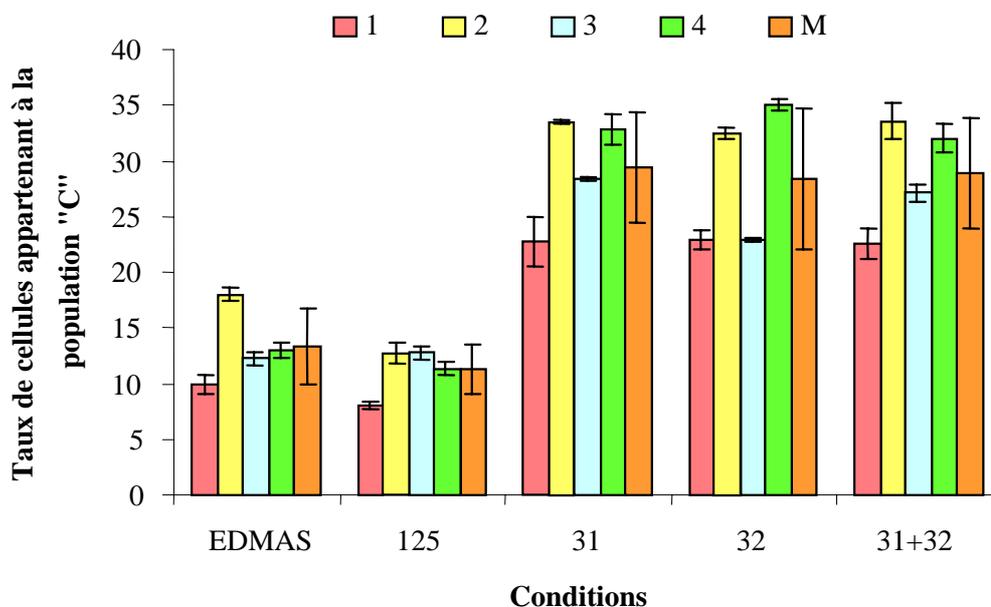


Figure 9. Pourcentage de la population "C" suite à un contact des hémocytes avec de l'EDMAS, la souche 125, 31 ou 32, le couple 31+32 pendant 5-6 h pour 4 expérimentations (1 à 4) en triplicats et leur moyenne (M).

Tableau 6. Distribution de la variance : part de variance expliquée des facteurs "expérimentation" et "condition" et de l'interaction des 2 sur la variance totale pour les paramètres "population C" (taux de cellules plus complexes appartenant à la zone "C" des cytogrammes), "phagocytose" (taux d'hémocytes ayant phagocyté des bactéries) et "mortalité" (taux d'hémocytes marqués à l'iodure de propidium). Les nombres entre parenthèses représentent le pourcentage par rapport à la variance totale.

Variance	Population "C"	Phagocytose	Mortalité
Totale	0,7684	1,405	0,185
Expérimentation	0,1074 (13,9)	0,5749 (40,9)	0,0248 (13,5)
Condition	0,6149 (80,1)	0,4129 (29,4)	0,0653 (35,1)
Interaction	0,0249 (3,3)	0,2210 (15,7)	0,0532 (28,6)

11.4.2 - Phagocytose des bactéries

Des hémocytes des expérimentations 2, 3 et 4 ont été observés en cyto centrifugation (Figure 10). Les pourcentages moyens de cellules ayant phagocyté des bactéries sont respectivement de 8,0 % pour l'EDMAS ; 26,4 % pour la souche 125 ; 17,1 % pour la souche 31 ; 27,1 % pour la souche 32 et 20,3 % pour le couple 31+32 (Figure 11). La condition EDMAS est significativement différente des quatre autres ($p < 0,05$). En comparant les conditions deux à deux, 31 et 31+32, 125 et 32, 125 et 31+32 ne sont pas significativement différents ($p > 0,05$), alors que 31 et 32, 31 et 125, 32 et 31+32 sont significativement différents ($p < 0,05$). Il semble donc que le taux d'hémocytes ayant phagocyté des bactéries en présence des souches 125 et 32 est supérieur à ceux en présence des souches 31 et 31+32.

L'analyse de variance du pourcentage de cellules ayant phagocyté des bactéries montre une influence plus forte du facteur "expérimentation", qui explique 40,9 % de la variance totale, par rapport au facteur "condition" qui n'en explique que 29,4 %. La variance totale est due pour 15,7 % à l'interaction entre les facteurs "condition" et "expérimentation" (Tableau 6). Des analyses de variance sont donc effectuées pour chaque expérimentation. Pour l'expérimentation 2, les conditions EDMAS et 125 sont chacune significativement différentes des quatre autres conditions ($p < 0,05$), par contre, les conditions 31, 32 et 31+32 ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$). Pour l'expérimentation 3, la seule différence significative est observée entre les conditions 32 et EDMAS ($p < 0,05$). Pour l'expérimentation 4, les conditions 31 et EDMAS ne sont pas significativement différentes entre elles et les conditions 32, 125 et 31+32 non plus ($p > 0,05$). En revanche, les conditions 31 et EDMAS sont significativement différentes des conditions 32, 125 et 31+32 ($p < 0,05$).

Il semble donc qu'il y ait des différences entre les taux d'hémocytes ayant phagocyté des bactéries, mais une forte variabilité est observée entre expérimentations.

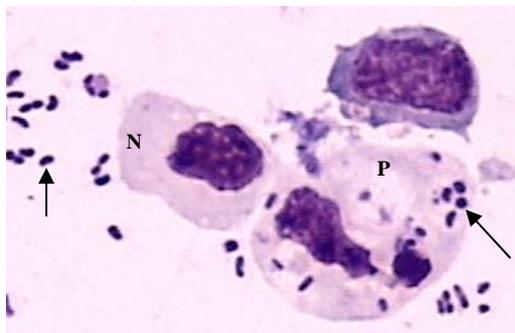


Figure 10. Cytocentrifugation d'hémocytes après contact avec le couple de souches 31+32, P : cellule ayant phagocyté des bactéries (↖), N : cellule n'ayant pas phagocyté de bactéries. Coloration Hémacolor, X600.

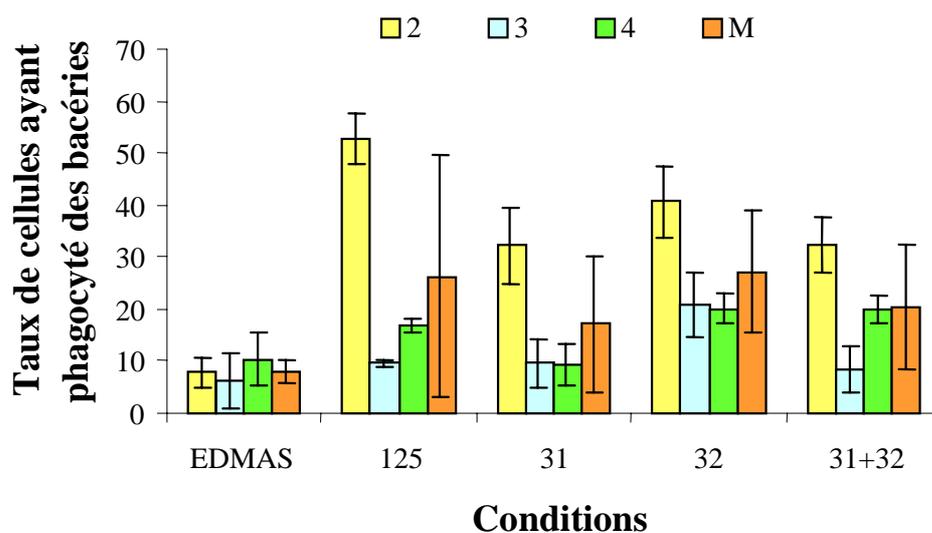


Figure 11. Taux d'hémocytes ayant phagocyté des bactéries après incubation de 5-6 h en contact avec EDMAS, la souche 125, 31, 32 ou le couple 31+32 pendant 5-6 h pour 3 expérimentations (2 à 4) en triplicats et leur moyenne (M). Ce facteur n'a pas été mesuré pour l'expérimentation 1.

11.4.3 - Taux de mortalité hémocytaire et apoptose

Après 5 à 6 h de contact hémocytes/bactéries, le taux moyen de mortalité hémocytaire reste inférieur à 10 % quelle que soit la souche testée. Le taux moyen de mortalité est de 2,0 % en

EDMAS ; 1,8 % en présence de la souche 125 ; 5,3 % en présence de la souche 31 ; 4,3 % en présence de la souche 32 et 3,69 % en présence du couple 31+32 (Figure 13a). En comparant les résultats deux à deux, EDMAS et 125, 31 et 32, 31 et 31+32, 32 et 31+32 ne sont pas significativement différents ($p > 0,05$). En revanche, les résultats entre les conditions 125 et EDMAS d'une part et les conditions 31, 32 et 31+32 d'autre part le sont ($p < 0,05$).

L'analyse de variance du taux de mortalité hémocytaire montre que le facteur "condition" influe sur la variance totale des résultats pour 35,1 % , alors que le facteur "expérimentation" et l'interaction des 2 facteurs expliquent, respectivement, 13,5 et 28,6 % de la variance totale (Tableau 6). L'effet de l'interaction est dû aux résultats de l'expérimentation 4 et plus particulièrement aux conditions 31 et 32, pour lesquelles les taux de mortalité hémocytaire sont largement supérieurs aux autres conditions et expérimentations (9,7 et 8 % respectivement). L'analyse de variance par expérimentation montre qu'il n'y a aucune différence significative entre les cinq conditions pour l'expérimentation 1. Les résultats des trois autres expérimentations sont comparables avec un taux de mortalité hémocytaire supérieur pour les conditions 31, 32 et 31+32 par rapport aux conditions EDMAS et 125.

Une expérimentation a été menée avec un contact hémocytes/bactéries de 12 h. Dans ce cas, les taux de mortalité hémocytaire induits sont de 13,6 % pour 31 ; 12,5 % pour 32 et 12,3 % pour 31+32 (Figure 13b), valeurs significativement supérieures ($p < 0,001$) à celles observées pour la souche 125 (3,3 %) et pour le témoin EDMAS (6,5 %).

Un marquage avec le kit Annexin V FITC sur des hémocytes en contact avec les bactéries 125 ou 31+32 pendant 12 h a montré une différence significative avec 0,7 % de cellules apoptotiques en présence de la souche 125 et 8 % en présence du couple 31+32 ($p < 0,001$). Cependant, ces taux sont faibles et ces résultats ne sont basés que sur une expérimentation en triplicats.

Les hémocytes mis au contact des souches 31 et/ou 32 subissent donc des mortalités significativement supérieures à celles des témoins.

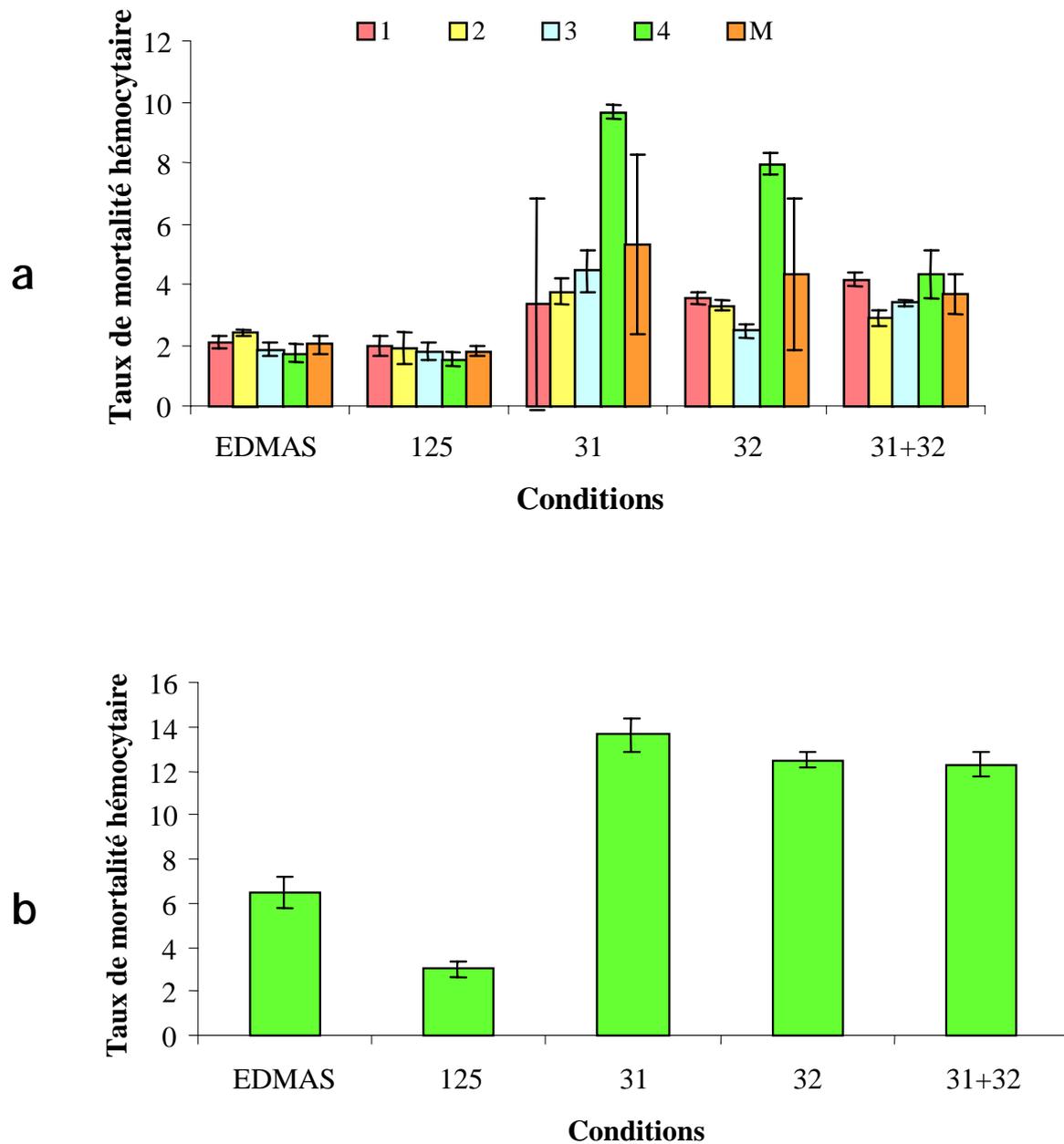


Figure 13 a et b. Taux de mortalité hémocytaire après incubation d'hémocytes avec EDMAS, la souche 125, 31, 32 ou le couple 31+32. a) contact hémocytes/bactéries 5-6h, 4 expérimentations en triplicats (1 à 4) et leur moyenne (M). b) contact hémocytes/bactéries 12 h en triplicats.

III - Influence de l'hôte sur l'action de souches de *Vibrio* pathogènes

Une maladie infectieuse résulte d'un déséquilibre entre l'hôte et le pathogène au bénéfice de celui-ci et/ou au détriment de celui-là. Ce déséquilibre peut être dû à des facteurs externes (facteurs physico-chimiques, polluants) et/ou internes aux deux protagonistes (virulence de l'agent infectieux, sensibilité accrue de l'hôte (Snieszko, 1974), Figure 14). Cette partie vise à étudier l'impact de facteurs intrinsèques à l'hôte (génétique et physiologique) sur les interactions entre *C. gigas* et des souches de *Vibrio* pathogènes, afin éventuellement d'améliorer l'infection expérimentale décrite précédemment.

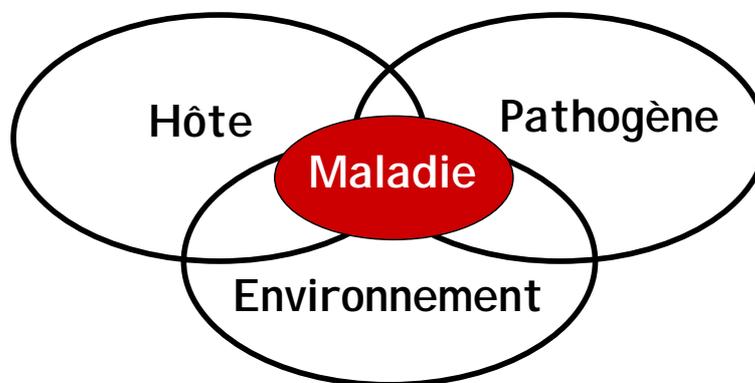


Figure 14. Diagramme de Snieszko : Schéma des interactions environnement - hôte - pathogène (Snieszko, 1974).

III.1 - Effet génétique

L'influence de facteurs génétiques sur la résistance à une maladie a été décrite à plusieurs reprises chez les mollusques (Beattie et al., 1980 ; Lapègue et al., 2003). Nous avons testé cette influence dans le cadre des interactions entre *C. gigas* et des souches de *Vibrio* pathogènes par infection expérimentale de familles biparentales (fratrie issue de deux parents uniquement). Ces familles ont été produites dans le cadre d'une thèse sur l'impact de facteurs génétiques sur la survie de *C. gigas* lors des épisodes de mortalités estivales (Dégremont, 2003 ; Samain et al., 2003). Elles étaient issues de croisements entre huîtres provenant du milieu naturel, élevées dans un premier temps en éclosérie (La Tremblade et Bouin) puis mises sur le terrain afin de tester leur résistance aux phénomènes de mortalités estivales. A la fin de l'été 2001, ces familles biparentales ont été classées soit "sensibles" (S, taux de survie inférieur à 70 %) soit "résistantes" (R, taux de survie supérieur à 90 %) en fonction des taux

de survie observés sur le terrain. Les descendants de ces familles R ou S (obtenus en croisant des individus issus de la première génération maintenus en structures expérimentales) ont conservé le caractère résistant ou sensible au phénomène des mortalités estivales.

Six familles R et six familles S de la première génération sont expérimentalement infectées par injection, dans le muscle adducteur, d'un mélange de souches virulentes (30/31/32/33) ou d'un mélange de souches non virulentes (45/46/47/48), trente individus étant testés par condition et par famille. Les individus utilisés, âgés de 6-9 mois, ont été maintenus en structure expérimentale et n'avaient pas subi de mortalité anormale avant l'infection expérimentale. Quelle que soit la famille, le taux de mortalité induit par le groupe de souches non virulentes est toujours inférieur à celui induit par le groupe de souches virulentes. Le taux de mortalité induit par le groupe de souches non virulentes est toujours inférieur à 10 %. En revanche, de fortes variations sont observées pour les taux de mortalité induits par le groupe de souches virulentes, sans lien avec le caractère R ou S des familles. Les taux de mortalité des familles S varient de 10,0 à 70,0 % et ceux des familles R de 3,3 à 56,7 % (Figure 15).

Des différences de sensibilité à l'infection expérimentale par des souches de *Vibrio* pathogènes sont donc observées entre familles biparentales, cependant, ces résultats ne sont apparemment pas corrélés à ceux obtenus sur le terrain lors des phénomènes de mortalités estivales.

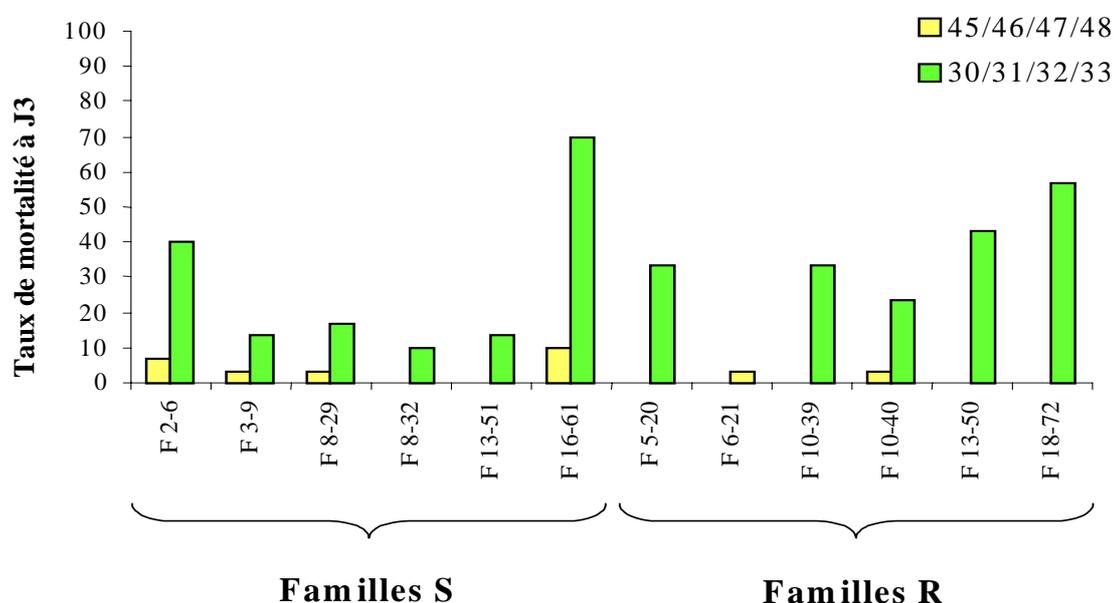


Figure 15. Taux de mortalité cumulée à J3 après injection de groupes de souches virulentes (30/31/32/33) ou non (45/46/47/48) à des lots de 30 huîtres issues de familles bi-parentales classées "sensibles" (S) ou "résistantes" (R) aux phénomènes de mortalités estivales suite à une étude *in situ*.

III.2 - Effet physiologique : effort de reproduction

La phase active de la gamétogénèse est une période de faiblesse énergétique accrue chez les bivalves. Plusieurs études suggèrent que cet état physiologique est un des facteurs intervenant dans le déclenchement des phénomènes de mortalités estivales (Imai et al., 1965 ; Myrand et al., 2000). Les huîtres en phase active de gamétogénèse consacrent la majeure partie de leur énergie à la reproduction au détriment de leurs mécanismes de défense s'exposant ainsi au développement d'agents infectieux. Le but de ces expérimentations est de déterminer si ce facteur physiologique intervient dans les interactions entre *C. gigas* et des souches de *Vibrio* pathogènes lors d'infections expérimentales.

L'étude présentée s'intègre dans une partie du programme MOREST s'attachant à l'analyse de l'effet du niveau trophique sur l'effort de reproduction (Annexe 5). Des huîtres sont placées dans 3 conditions trophiques (apport de 4, 8 ou 12 % de matière sèche d'algues par biomasse de chair sèche d'huîtres, nommées CN1, CN2 et CN3) pendant un an tout en suivant un cycle annuel de température et de photopériode comparable à celui du bassin de Marennes - Oléron (8-20 °C). Différents paramètres sont mesurés chaque mois tels que croissances somatique et germinale, filtration, absorption, respiration et potentiel de croissance. En 2002, les trois conditions trophiques et une seule population multiparentale d'huîtres produite en 2001 en éclosion sont testées. En 2003, les deux conditions trophiques extrêmes (CN1 et CN3) et deux populations d'huîtres produites en 2002 en éclosion et constituées d'un mélange de familles biparentales "résistantes" (R) ou "sensibles" (S) aux phénomènes de mortalités estivales (issues des mêmes croisements que décrits précédemment) sont testées. Après six mois de maintien en conditions contrôlées, ces huîtres sont expédiées de l'éclosion d'Argenton (Bretagne) au laboratoire de La Tremblade et sont testées en infection expérimentale. Pour chaque population et condition trophique, 30 huîtres sont injectées dans le muscle adducteur soit avec une souche peu pathogène (souche 47, *V. gigantis* ou souche 125, *V. mediterranei*), soit avec le couple de souches virulentes (31+32 proches de *V. splendidus*).

En 2002, la pathologie expérimentale est réalisée alors que les huîtres sont en phase de préonte. Les huîtres présentent une sensibilité différentielle en fonction du régime alimentaire et de la souche injectée (Figure 16). Plus la quantité de microalgues était importante, plus l'effort de reproduction a été intense et plus les taux de mortalité induits en infection expérimentale sont importants. Cette sensibilité est observée suite à l'injection du couple 31+32 (taux de mortalité de 23,3 ; 46,7 et 70 % respectivement pour les conditions

CN1, CN2 et CN3) mais également suite à l'injection de la souche 47 (taux de mortalité de 3,3 ; 10 et 16,7 % respectivement pour les conditions CN1, CN2 et CN3 ; Figure 16). Le test du χ^2 est utilisé pour comparer les taux de mortalité deux à deux (Tableau 7). Pour la souche 47, les taux de mortalité induits pour les différentes conditions trophiques ne sont pas significativement différents ($p > 0,05$). Pour le mélange 31+32, ils sont significativement différents ($p < 0,001$) uniquement quand les conditions trophiques CN1 et CN3 sont comparées, les autres comparaisons n'étant pas significativement différentes ($p > 0,05$). Cependant, pour une condition donnée, le taux de mortalité induit par la souche non virulente 47 est toujours inférieur à celui induit par 31+32 et ce de façon significative ($p < 0,01$) pour les conditions CN2 et CN3, la différence pour la condition CN1 n'étant pas significative ($p > 0,05$).

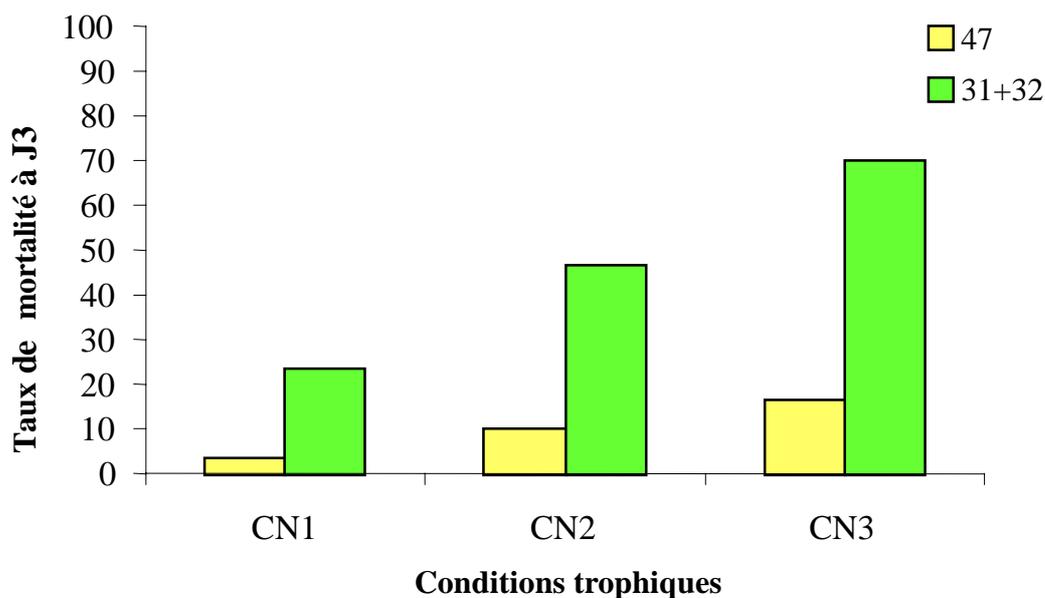


Figure 16. Taux de mortalité cumulée à J3 après injection de souches virulentes (31+32) ou non (47) à des lots de 30 huîtres ayant subi des conditionnements trophiques différents en 2002.

Tableau 7. Résultats des tests du χ^2 sur les nombres d'individus vivants ou morts pour les infections expérimentales sur les huîtres ayant subi des conditionnements trophiques différents en 2002, valeurs significatives surlignées en jaune.

Facteurs comparés	Condition	Valeurs de χ^2
Injection : 47/31+32	CN1	3.61
	CN2	8.21
	CN3	15.27
Régime trophique CN1/CN2	47	0.27
	31+32	2.64
Régime trophique CN2/CN3	47	0.14
	31+32	2.47
Régime trophique CN1/CN3	47	1.67
	31+32	11.52

En 2003, suite à un problème technique, les huîtres ont perdu dès leur arrivée au laboratoire de La Tremblade. L'infection expérimentale a eu lieu 48 h après la ponte. Les taux de mortalité induits ne reflètent plus une influence du régime alimentaire (Figure 17). Les taux de mortalité induits par la souche non virulente 125 sont toujours inférieurs à ceux induits par le couple de souches virulentes 31+32 mais de façon non significative ($p > 0,05$) sauf pour le lot d'huîtres R dans la condition trophique CN3 (Tableau 8). En regroupant les taux de mortalité des lots d'huîtres R et S, aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été observée pour les 2 conditions trophiques CN1 et CN3 quelle que soit la (ou les) souche(s) injectée(s). De même, en regroupant les conditions trophiques CN1 et CN3, il n'y a aucune différence significative entre les lots d'huîtres R et S ($p > 0,05$) quelle que soit la (ou les) souche(s) injectée(s).

L'expérimentation menée en 2002 montre une forte corrélation entre le stade de maturation et la sensibilité à l'infection expérimentale, cependant, l'expérimentation menée en 2003 montre que cet effet n'est plus observé rapidement après la ponte.

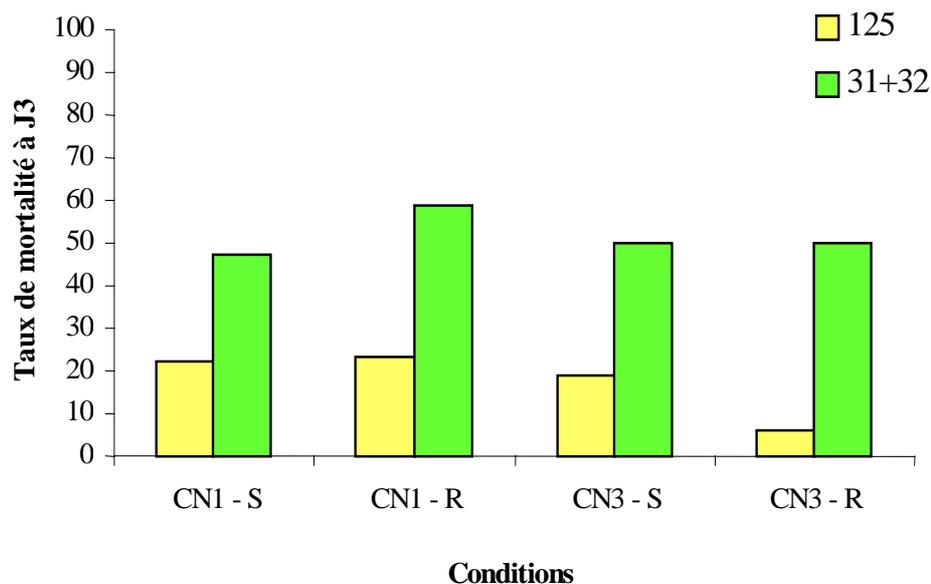


Figure 17. Taux de mortalité cumulée à J3 après injection de souches virulentes (31+32) ou non (125) à des lots d'huîtres "R" ou "S" ayant subi des conditionnements trophiques différents en 2003.

Tableau 8. Résultats des tests du χ^2 sur les nombres d'individus vivants ou morts pour les infections expérimentales sur les huîtres ayant subi des conditionnements trophiques différents en 2003, valeurs significatives surlignées en jaune.

Facteurs comparés	Condition	Valeurs de χ^2
Injection : 125/31+32	CN1-R	3.04
	CN1-S	1.57
	CN3-R	5.86
	CN3-S	2.39
Régime trophique CN1/CN3	R-125	0.80
	S-125	0.03
	125	0.62
Régime trophique CN1/CN3	R-31+32	0.27
	S-31+32	0.02
	31+32	0.06
Lots d'huîtres R/S	125-CN1	0.1
	125-CN3	0.29
	125	0.34
Lots d'huîtres R/S	31+32-CN1	0.47
	31+32-CN3	0.27
	31+32	0.23

IV - Sélection de souches inhibitrices de souches de *Vibrio* pathogènes

Les traitements utilisés contre les agents infectieux d'origine bactérienne sont variés mais tous ne sont pas utilisables pour les mollusques d'intérêt aquacole à cause des pratiques d'élevage en milieu ouvert. De plus, l'absence d'un système immunitaire adaptatif rend la vaccination impossible. De ce fait, la prévention est aujourd'hui la meilleure méthode pour lutter contre ces pathogènes (Verschuere et al., 2000b).

Dans ce travail, la souche pathogène 32 (apparentée au groupe polyphylétique de *V. splendidus*) a été utilisée pour une recherche *in vitro* de souches inhibitrices de bactéries pathogènes de mollusques d'élevage. L'origine des souches probiotiques décrites dans la littérature est très variée (environnement terrestre, environnement des animaux, animaux eux-mêmes). Nous avons recherché des souches inhibitrices dans l'hémolymphe d'huîtres saines. Dans l'éventualité d'une application, une souche probiotique doit avoir la capacité de coloniser durablement l'animal, ce qui est probablement plus facile pour des souches présentes dans cet environnement. Au sein de la collection précédemment établie, certaines souches semblent inhiber la pathogénicité d'autres, laissant supposer l'existence de phénomènes d'antagonisme au sein de la flore bactérienne de *C. gigas* (Article 1). Cependant, des tests préliminaires ont montré que ces souches ne présentent apparemment pas de capacité inhibitrice de la croissance d'autres souches de *Vibrio*. Cette dernière observation nous a incités à en sélectionner de nouvelles plutôt que d'utiliser celles de la collection.

IV.1 - Sélection et caractérisation des souches inhibitrices

La recherche de souches inhibitrices de la souche 32 a été effectuée en utilisant la technique de filtration sur membrane HGMF (hydrophobic grid membrane filtration, QA Life Science, Inc) pour de l'hémolymphe d'huîtres saines et une révélation par inondation de la gélose avec une suspension de la souche 32 dite souche sensible. Deux souches à activité inhibitrice de la souche 32 ont été isolées, LGPC2 et LGPC7. Une analyse phylogénétique basée sur le gène de l'ARN 16S a révélé que LGPC7 appartient au genre *Pseudomonas* et LGPC2 au genre *Pseudoalteromonas*. Cette dernière présentant une activité inhibitrice plus intense, elle a été sélectionnée pour le reste des travaux.

IV.2 - Caractérisation biochimique et spectre d'activité de la molécule antibiotique

Des analyses biochimiques ont montré que la fraction active de la molécule inhibitrice n'est pas de nature protéique ou saccharidique. La taille de la molécule est inférieure à 1 kDa. L'activité inhibitrice résiste à un traitement à 100 °C pendant 10 min ou à -20 °C pendant 48 h. Malgré une réaction positive sur milieu CAS (pour la détection de sidérophores) et les caractéristiques décrites ci-dessus, cette molécule n'est pas un sidérophore. En effet, sa production n'est pas influencée par la concentration en fer du milieu. Les résultats obtenus montrent que le spectre d'activité de la souche LGPC2 est relativement étroit, limité à des bactéries Gram négatif : la majorité des souches de *Vibrio* (*V. aestuarianus*, *V. chagasii*, *Vibrio cholerae*, *V. crassostreae*, *V. cyclitrophicus*, *V. kanaloae*, *V. lentus*, *V. pomeroyi*, *V. splendidus*, *V. tapetis*, *V. tasmaniensis*) ainsi que des souches des genres *Shigella* et *Escherichia*.

IV.3 - Cocultures

Afin d'étudier la croissance de la souche sensible 32 en présence de la souche inhibitrice LGPC2, des expérimentations de cocultures ont été réalisées. Une mutagenèse avec de la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) a été effectuée sur la souche LGPC2 dans le but d'obtenir un mutant non producteur de la substance inhibitrice (nommé NTG720), celui-ci servant de témoin. La croissance de la souche 32 est fortement inhibée lorsque la concentration initiale de la souche 32 est inférieure à celle de LGPC2 : la souche LGPC2 étant inoculée à 10^7 UFC.ml⁻¹, quand la souche 32 est inoculée à 10^4 ou 10^6 UFC.ml⁻¹, elle n'est plus détectée dans le milieu de culture au bout de respectivement 2 ou 3 heures. Cette inhibition n'est pas due à un phénomène de compétition entre les 2 souches puisque aucune inhibition de la croissance de la souche 32 n'est observée dans les cocultures avec le mutant de LGPC2 non producteur. En revanche, quand les 2 souches sont présentes à des concentrations similaires (10^7 UFC.ml⁻¹), aucune inhibition n'est observée même après 24 h de contact.

IV.4 - Effet du surnageant

L'activité inhibitrice du surnageant de culture de LGPC2 a été évaluée en mettant en contact la souche 32 (concentration initiale de $2,5 \cdot 10^7$ UFC.ml⁻¹) avec celui-ci, du surnageant de NTG720 ou du milieu de culture. Après 24 h de contact, la concentration de 32 dans le milieu de culture et dans le surnageant de NTG720 est équivalente (10^9 UFC.ml⁻¹) alors que celle dans le surnageant de LGPC2 est de 10^5 UFC.ml⁻¹, soit une diminution de deux unités logarithmiques par rapport à la concentration initiale. Une expérimentation similaire effectuée avec des surnageants de culture de LGPC2 collectés à différents temps de culture montre que la molécule inhibitrice est produite à partir de 6 h de culture, soit à la fin de la phase exponentielle.

La souche de *Pseudoalteromonas* LGPC2 possède donc une activité inhibitrice de nombreuses souches de *Vibrio*, activité due à une molécule bactéricide de petite taille.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude est regroupé dans un article en préparation : **Article 3 : *In vitro* inhibition of a *Vibrio splendidus*-related strain, pathogenic for the oyster *Crassostrea gigas*, by a *Pseudoalteromonas* strain**

***In vitro* inhibition of a *Vibrio splendidus*-related strain pathogenic for the oyster *Crassostrea gigas* by a *Pseudoalteromonas* strain**

INTRODUCTION

Severe mortality outbreaks have been restraining the development of intensive culture for many fish and shellfish species. The genus *Vibrio* is one of the most implicated pathogen groups in these events. Pathogenic *Vibrio* strains have been isolated from larval, juvenile or adult stages (2, 8, 14, 15, 36, 59). In the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, several potentially pathogenic strains belonging to the genus *Vibrio* were associated with summer mortality outbreaks (19, 20, 35, 38, 64).

However, due to cultural practices in open environment, very few treatments are available for mollusks. Furthermore, vaccination is not possible for invertebrates (4). Due to the occurrence and spreading of resistance genes, the use of antibiotics as prophylactic treatments is not recommended anymore (44, 56). Alternative strategies have thus been sought in order to decrease antibiotic use. Other strategies implied better husbandry practices (52) and selection/production of disease resistant animals (4, 7). A very promising alternative is the use of probiotics which are living bacteria with a beneficial effect on the host (modification of the host-associated or ambient microbial community, improvement of the use of the food, enhancement of the host defense mechanisms, or improvement of the quality of its ambient environment) (29, 62). Over the past twenty years, numerous studies have evaluated the potential of different inhibitory bacteria, which modes of action are mainly production of antibacterial compounds and competition for nutrients or adhesion sites (29, 62).

Since *Vibrio* is the dominant genus of the microflora associated with aquacultural species and also the genus mostly implicated in bacterial diseases, many studies have dealt with the selection of strains active against this genus. Bacterial strains from several genera have been found as potential probiotics: *Lactobacillus* (63), *Bacillus* (49), *Aeromonas* (21, 50), *Pseudomonas* (23), *Carnobacterium* (33) and *Vibrio* (3).

Pseudoalteromonas species have been isolated from a wide variety of marine environments such as coastal waters (10), squid egg capsules (5), surface of marine alga (12) and animals (24). Even though *Pseudoalteromonas* strains have been rarely described as putative probiotics in aquaculture (1, 51, 54), many *Pseudoalteromonas* strains display biological

activities such as antibacterial (30, 31), anti-fungal (34), algicidal (39) and inhibition or promotion of settlement of invertebrate larvae or development of algal spores (13)(24).

In former studies, an experimental infection in *C. gigas* spat, based on two *Vibrio splendidus*-related strains (named 31 and 32), has been set up and studied (20). In the present study, the *in vitro* inhibition of the *Vibrio splendidus*-related pathogenic strain 32 by a selected antagonistic *Pseudoalteromonas* strain was studied. Moreover, the produced inhibitory substance was partially characterized.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions

Strains used for the inhibitory spectrum are listed in Table 1. Among them, *Vibrio splendidus*-related strain 32 was usually used as the sensitive test strain. This strain had been isolated from oysters *Crassostrea gigas*, suffering from summer mortality outbreak and found pathogenic in experimental infections (20). Non-*Vibrio* strains were grown and maintained in appropriate media and at appropriate temperature. *Vibrio* strains were maintained on Zobell agar (Difco 2216E) at 4 °C and stored at -80°C in Zobell plus 20 % (vol/vol) glycerol. *Vibrio* and antagonistic strains were grown in an orbital agitating incubator (160 rpm) for 20 h at 20 °C (except for *V. nigripulchritudo* and *V. cholerae* at 25 and 30 °C respectively) in Zobell or in M9GCNT. This last medium was based on minimal medium M9 (55) modified for marine bacteria (NaCl 2 %) and supplemented with glucose (4 %), casamino acids (3 %) and thiamine (0,1 %) (23). Enumerations were carried out on Zobell (allowing both target and antagonistic strain growths) and on TCBS media (Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose, BioRad, specific of the *Vibrionaceae* flora and thus allowing only target strain growth). Sterile artificial seawater (SASW; NaCl 2.34 %, KCl 0.15 %, MgSO₄ 7H₂O 0.12 %, CaCl₂ 2H₂O 0.15 %, anhydrous CaCl₂ 0.15 %, distilled water 1 l) was used for bacterial dilutions and suspensions. Solid or soft media were prepared by adding 1.2 % or 0.6 % (w/v) type E agar (Biokar). Chemicals were purchased from Fluka.

Table 1. Inhibitory spectrum of LGPC2.

Strain ^a	Inhibition ^b
<i>Bacillus cereus</i> (*)	R
<i>Bacillus subtilis</i> CIP 52.62	R
<i>Bacillus thuringiensis</i> HD9 (*)	R
<i>Enterococcus faecalis</i> CIP 103214	R
<i>Lactobacillus plantarum</i> CIP 102506 ^T	R
<i>Lactobacillus lactis</i> sp. <i>lactis</i> INA 45 (*)	R
<i>Micrococcus luteus</i> CIP A270 ^T	R
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	R
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp <i>aureus</i> CIP 53154	R
<i>Escherichia coli</i> MC4100 ATCC 35695	S
<i>Escherichia coli</i> DH5 α (Invitrogen)	S
<i>Escherichia coli</i> entéro-pathogène O111 CIP 52168	S
<i>Escherichia coli</i> entéro-pathogène O26 CIP 52172	S
<i>Escherichia coli</i> entéro-pathogène (*)	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp <i>pneumoniae</i> CIP 53153	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (*)	R
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	R
<i>Salmonella</i> Enteritidis (*)	R
<i>Salmonella</i> Typhimurium CIP 5858	R
<i>Salmonella</i> Typhimurium (*)	R
<i>Shigella sonnei</i> CIP 5255	S
<i>Shigella flexneri</i> CIP 5236	S
<i>Vibrio</i> sp. S322 (°)	S
<i>Vibrio aestuarianus</i> 01/32 (°)	S
<i>Vibrio aestuarianus</i> strain 39 (°)	S
<i>Vibrio aestuarianus</i> strain 40 (°)	S
<i>Vibrio chagasii</i> LMG 21353 ^T	S
<i>Vibrio cholerae</i> CIP 56.38	S
<i>Vibrio crassostreae</i> 107 (°)	S
<i>Vibrio cyclotrophicus</i> LMG 21359 ^T	S
<i>Vibrio kanaloae</i> LMG 20539 ^T	S
<i>Vibrio lentus</i> CIP 107166 ^T	S
<i>Vibrio nigripulchritudo</i> CIP 103195 ^T	R
<i>Vibrio pomeroyi</i> LMG 20537 ^T	S
<i>Vibrio splendidus</i> LMG 2042 ^T	S
<i>Vibrio splendidus</i> -related strain 31 (°)	S
<i>Vibrio splendidus</i> -related strain 32 (°)	S
<i>Vibrio tapetis</i> CECT4600 ^T	S
<i>Vibrio tasmaniensis</i> LMG 20012 ^T	S

^a (*):collection of Laboratoire de Biotechnologies et de Chimie Bio-organique (Université de La Rochelle, France); (°):collection of the European Community Reference Laboratory for Molluscs Diseases (Centre de ressources biologiques, Laboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER, La Tremblade, France); ATCC: American Type Culture Collection; CECT: Colección Española de Cultivos Tipos; CIP: Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France; LMG: Laboratorium voor Mikrobiologie, Gent, Belgium

^b R: resistant to the inhibitory activity of LGPC2; S: susceptible to the inhibitory activity of LGPC2

Screening of antagonistic strains and evaluation of inhibitory activity

Hemolymph was sampled from the pericardial cavity of *C. gigas* oysters (origin Fouras, French Atlantic Coast) and pooled from five individuals. Cultivable flora had been previously estimated at 10^3 CFU.ml⁻¹ in oyster hemolymph. Thus, one-tenth dilutions were used for filtration on HGMF membrane (hydrophobic grid membrane filtration, QA Life Science, Inc) with the ISO-GRID filtration system to obtain about 100 colonies per membrane after incubation at 20 °C on Zobell agar for 48h. After removing the filters, inhibitory activities were revealed by pouring on the plates 3 ml of a suspension of the target strain (about 10^6 - 10^7 CFU.ml⁻¹); after 5 min, plates were drained, incubated at 20 °C for 24 h and inhibitory zones were observed.

Inhibitory activity of isolated strains was tested on solid media by laying a colony on a piece of HGMF membrane and incubating it at 20 °C on Zobell. Inhibitory activities were revealed as described above.

Culture supernatant was collected after centrifugation (30 min, 13 000 g, 4 °C) of a 20 h culture (except when notified) in M9GCNT under orbital shaking (160 rpm) at 20 °C. Its inhibitory activity was evaluated by the well agar diffusion method. Briefly, 3 ml of a suspension of the target strain (about 10^6 - 10^7 CFU.ml⁻¹) was poured on a Petri dish containing about 12 ml of Zobell agar; after 5 min, the plate was drained. Sterile glass rings (4-mm i.d.) were placed on the agar and filled with 20 µl of supernatant. Plates were then incubated at 20 °C for 24 h and examined for halos of inhibition.

Identification of the antagonistic strains

DNA extraction, SSU rDNA amplification and sequencing were performed using primers and methods previously described (37). Sequences were aligned using the online ClustalW software (60) of the European Bioinformatics Institute (www.ebi.ac.uk). A phylogenetic tree was generated using the TREECON software package (61).

Characterization of the inhibitory substance

Effect of enzymes and temperature on the inhibitory substance was evaluated on culture supernatant. Activity of proteinase K (0.2 mg.ml⁻¹, 20 mM Tris-HCl, pH 7.0) and α -amylase (0.2 mg.ml⁻¹, 30 mM Sodium Acetate, pH 6.0) on the inhibitory substance was tested with a 1 h incubation at 37 °C. Effect of temperature was evaluated after heating at 100 °C for 10 min or freezing at -20 °C for 48 h. Treated supernatant activity was then tested using the well agar diffusion method described above.

Size of the inhibitory molecule was evaluated by laying a colony on a piece of dialysis membrane with a molecular exclusion limit of 1, 6-8 or 12-14 kDa and incubating it at 20 °C on Zobell. Activities were revealed as described above.

The inhibitory spectrum of the antagonistic substance was evaluated on a collection of Gram positive and negative strains including a collection of *Vibrio* strains (Table 1) as described above except for the non *Vibrio* strains. For these strains, inhibitory activity was revealed as follow: after removing the HGMP filters, plates were overlaid with 5 ml of soft agar seeded with 10^7 CFU.ml⁻¹ of the tested strain and incubated at the optimal growth temperature.

Siderophore production was assayed on chrome azurol S (CAS) agar based on M9GCNT (22, 43, 57).

The influence of iron on the production of the inhibitory substance was evaluated on Zobell solid media either iron supplemented (0,1 mM FeCl₃), or kept unmodified. Inhibition zones were revealed as described above.

Isolation of mutants lacking inhibitory activity

Mutagenesis using N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine was performed according to Lee et al. (39) protocol modified as follow. Five milliliters of liquid Zobell medium were inoculated at 1 % with an overnight pre-culture of the antagonistic strain and incubated for 7 h at 20 °C under shaking. Cells were harvested by centrifugation (4 000 g, 10 min). Bacteria were washed twice in SASW and resuspended in 2 ml of SASW. They were then mutagenized with 50 µg.ml⁻¹ of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) at 20 °C for 1 h. Afterwards, they were washed twice with SASW, resuspended in 3 ml of liquid Zobell medium and incubated overnight at 20 °C under shaking. Dilutions of the overnight culture were spread on Zobell and incubated for 48h. Inhibitory activity of mutagenized colonies was assessed as described above. Strains producing no antagonistic activity were selected.

Coculture experiments

Cocultures were carried out in erlenmeyer flasks in M9GCNT broth under orbital shaking (160 rpm, 20 °C). Strains were pre-cultured for 20h in M9GCNT. M9GCNT was inoculated in a flask at 1 % with the antagonistic strain pre-culture. Different concentrations (10^4 , 10^6 or 10^7 CFU.ml⁻¹) of the target strain were added to this flask as soon as the antagonistic strain exponential phase growth started (after about 2 h, evaluated by optical density). Cultures were sampled every hour from 0 to 4 hours post mixing time to follow the growth of both strains by

enumeration on plates of Zobell and TCBS. For each experiment, control consisted of a flask under the same conditions and inoculated with the non-producing mutant strain instead of the antagonistic one. For each target strain concentration, experiments were conducted in triplicates.

Effect of the supernatant on the target strain

Antagonistic and non-producing mutant strain culture supernatants were obtained as described above. Supernatants were heated for 10 min at 100 °C. Non-producing mutant and antagonistic strain supernatants were inoculated at 1% (v/v) with a 20 h pre-culture of the target strain (about 10^7 CFU.ml⁻¹) and incubated at 20 °C without shaking. At 0, 3, 6 and 24 h post inoculation of the target strain, each condition was sampled for enumeration on Zobell agar plates.

RESULTS

Isolation and characterisation of active strains

The screening of oyster hemolymph flora led to the selection of 2 strains (LGPC2 and LGPC7) active *in vitro* against strain 32. LGPC2 cells were rod-shaped, small, Gram-negative, oxidase positive and catalase negative. LGPC7 cells were rod shaped, Gram-negative, oxidase and catalase positive. Following phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequences, LGPC2 belongs to the *Pseudoalteromonas* genus (Figure 1) whereas LGPC7 belongs to the *Pseudomonas* genus (not shown).

Since strain LGPC2 induced a stronger strain 32 growth inhibition than strain LGPC7, it was selected for the rest of this study.

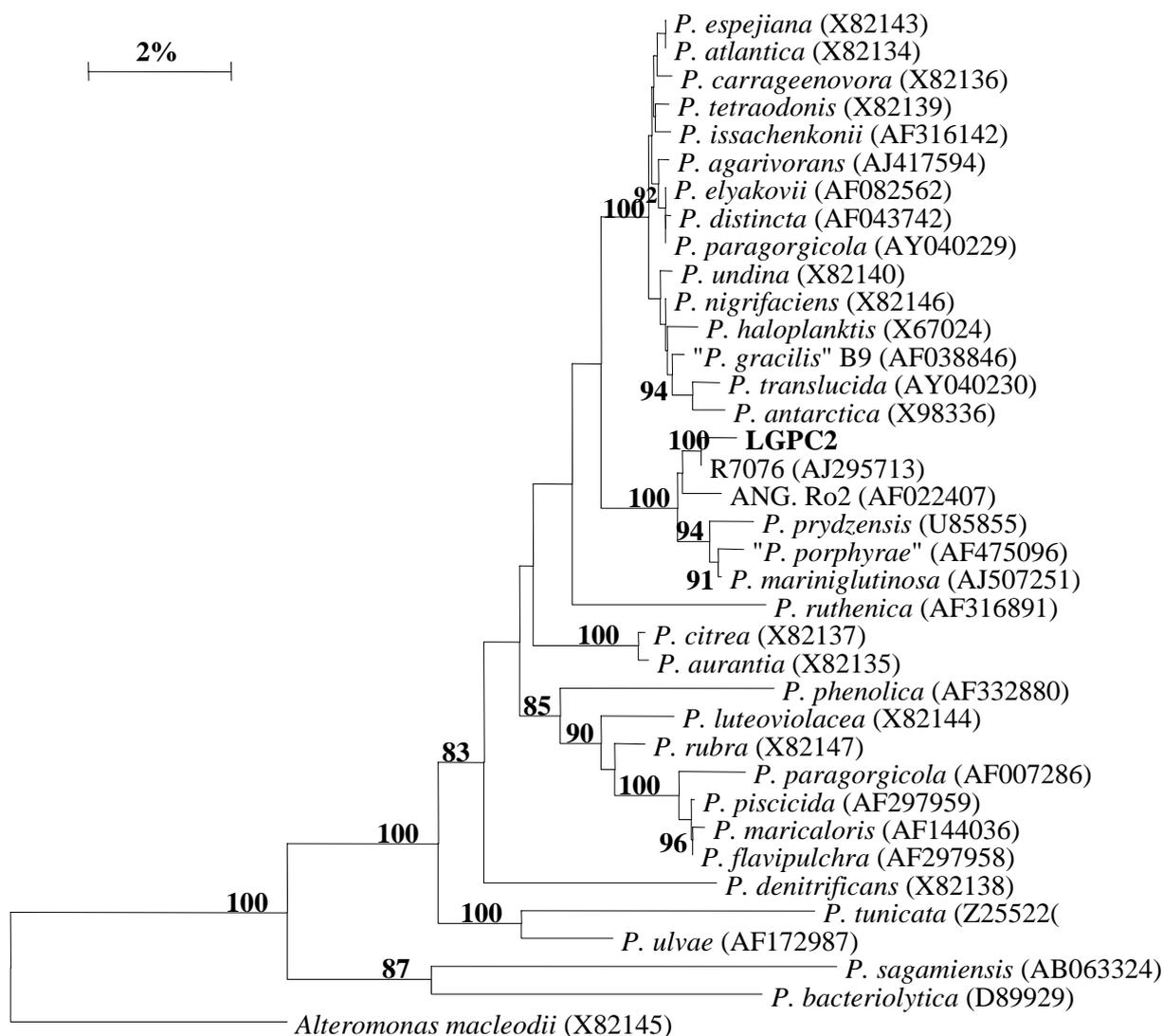


Figure 1. Neighbour-joining phylogenetic tree of partial 16S rDNA sequences using the distance method of Kimura (Kimura, 1980); insertion-deletion considered, *Alteromonas macleodii* as outgroup, 1200 gap-free sites were compared. Numbers at nodes represent bootstrap values (1000 cycles) over 80%.

Characterization of the inhibitory substance

The inhibitory activity of LGPC2 supernatant was not affected by proteinase K or α -amylase treatment nor by heating or freezing treatments, even though the substance seemed slightly less active after these temperature shocks.

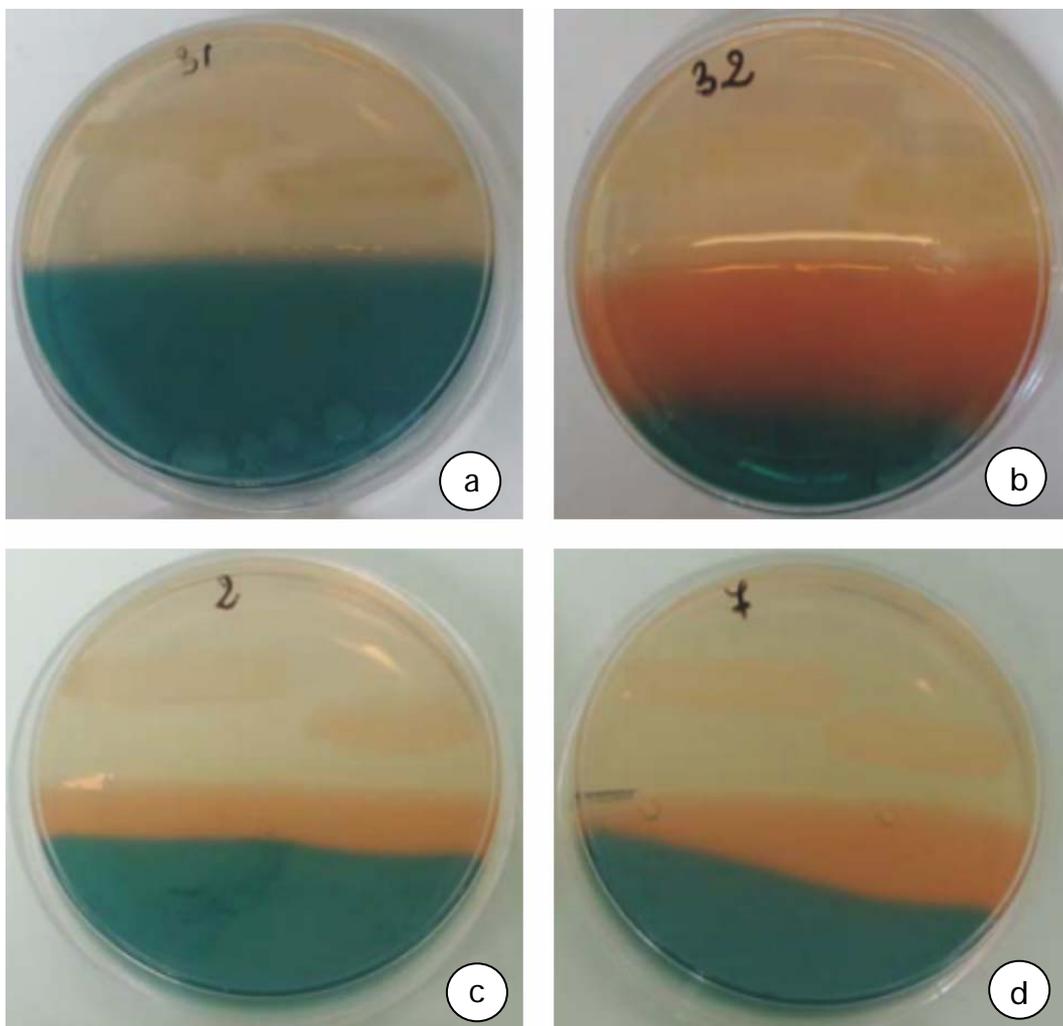
Since the molecule passed through every tested membrane, its molecular size was less than 1 kDa.

The spectrum of activity on various Gram-positive and Gram-negative bacteria is given on Table 1. No Gram-positive strains was inhibited. Among the non-*Vibrio* strains, only

Escherichia and *Shigella* strains were inhibited. All the tested *Vibrio* strains were inhibited by LGPC2 except for *V. nigripulchritudo*.

The *V. splendidus*-related strain 32, the *Pseudoalteromonas* strain LGPC2 and the *Pseudomonas* strain LGPC7 induced a positive reaction of the CAS medium, revealing that these strains produced siderophores, whereas *V. splendidus*-related strain 31 did not (Figure 2). However, the supplementation with FeCl_3 of the Zobell media did not modify the inhibitory activity of LGPC2 against strain 32.

Figure 2. Siderophore detection using the CAS assay for the strain 31 (a), 32 (b), LGPC2 (c), LGPC7 (d).



Selection of non producing strains

Following NTG mutagenesis, eight out of 1500 tested colonies displayed no inhibitory activity against strain 32. Growth curves of these eight colonies and of LGPC2 were compared (not shown). Since NTG720 showed a very similar growth to LGPC2, it was selected as negative control.

Cocultures

In all experiments, LGPC2 and NTG720 concentrations were inoculated at about 10^7 CFU.ml⁻¹.

In a first set of experiments (figure 4a), strain 32 was inoculated at about 10^4 CFU.ml⁻¹. After 1 hour, strain 32 dropped to less than 10 CFU.ml⁻¹ in the coculture with LGPC2. After 2 hours, no viable strain 32 cell could be detected. Strain 32 concentration in the coculture with NTG720 slightly decreased of about half a log unit at 4 h post mixing time. After 10 and 30 hours of coculture, no strain 32 could be detected in the LGPC2 coculture by spreading on TCBS or Zobell.

In a second set of experiments (Figure 4b), strain 32 was inoculated at about 10^6 CFU.ml⁻¹. After one hour, strain 32 concentration has already dropped of about 3 log units, in the coculture with LGPC2. No viable strain 32 cell could be detected after 3 or 4 h. After 4 hours, strain 32 concentration in the coculture with NTG720 displayed a slight decrease (about half a log unit).

In a third set of experiments (Figure 4c), strain 32 was inoculated at about 10^7 CFU.ml⁻¹. After 1 to 24 hours, no decrease of strain 32 concentration could be observed.

The growth of strain 32 was inhibited by LGPC2 until its initial concentration was above the concentration of LGPC2 (Figure 4a, b). No inhibition was observed when both strains were at similar initial concentrations (Figure 4c)

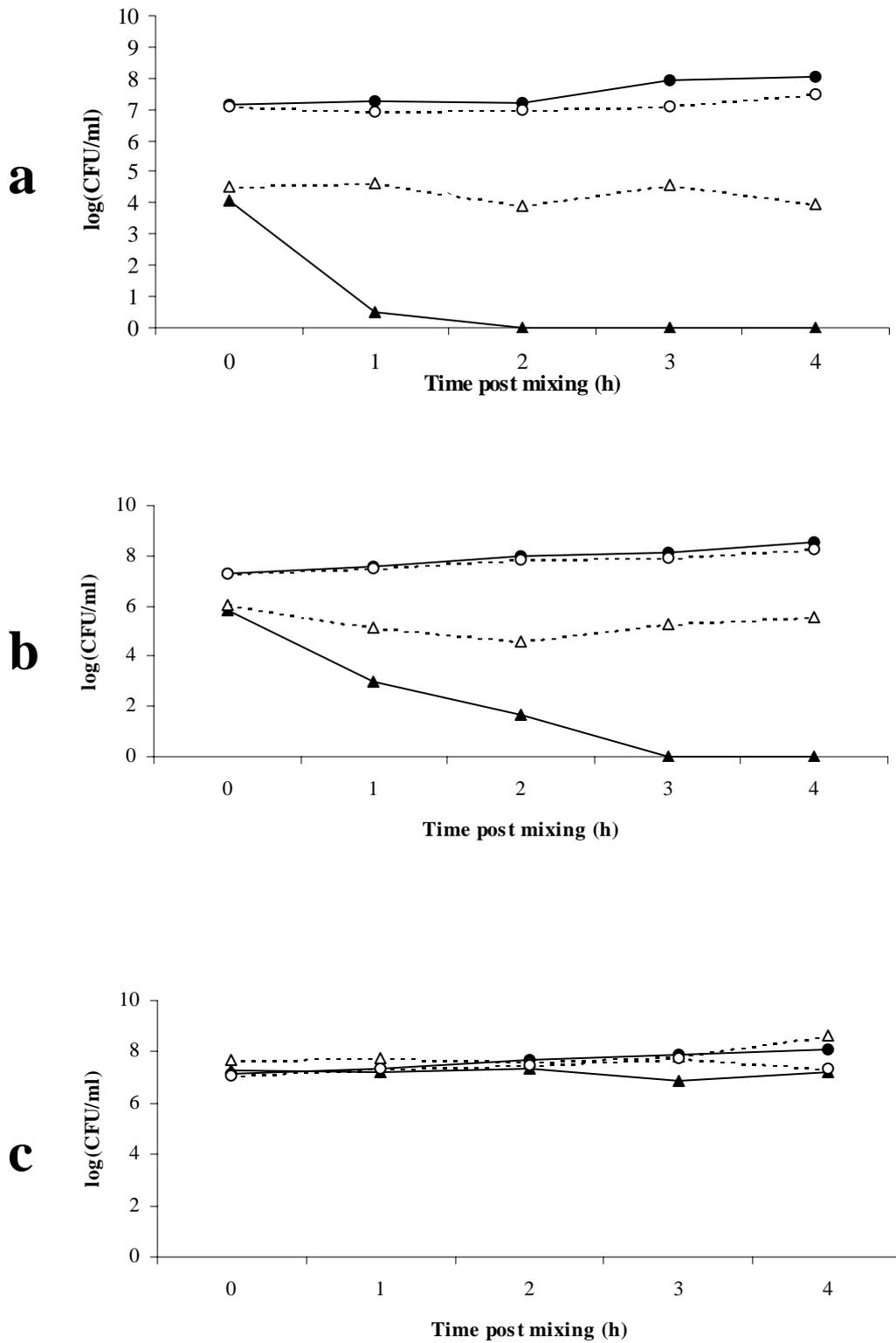


Figure 3. Cocultures. Three concentrations of the target strain 32 were tested: 10^4 (a), 10^6 (b) and 10^7 CFU.mL⁻¹ (c). Results are mean values of triplicate experiments. Strain LGPC2 (λ), Strain NTG720 (μ), Strain 32 mixed with LGPC2 (σ), Strain 32 mixed with NTG720 (Δ)

Action of LGPC2 or NTG720 supernatant

Strain 32 was inoculated in fresh M9GCNT, in NTG720 supernatant or in LGPC2 supernatant at $2,5 \cdot 10^7$ CFU.ml⁻¹. At 6 h post inoculation, strain 32 has grown in M9GCNT, was stable in NTG720 supernatant and has decreased of about one log unit in LGPC2 supernatant. At 24 h post inoculation, strain 32 concentrations in M9GCNT and in NTG720 supernatant were similar (about 10^9 CFU.ml⁻¹) whereas it has dropped to almost 10^5 CFU.ml⁻¹ in LGPC2 supernatant.

Supernatant at different culture time (2, 4, 6, 12, 18, 24 h) were inoculated with strain 32 (about 10^5 CFU.ml⁻¹) to evaluate the kinetics of production of the inhibitory substance. Control consisted of M9GCNT similarly inoculated with strain 32. Strain 32 in M9GCNT, 2 and 4 hour supernatants had similar growth. Strain 32 concentration strongly decreased in 6, 12, 18 and 24 h supernatants, indicating that the inhibitory substance was produced from 6 h of culture, corresponding to the end of the exponential growth phase (not shown).

DISCUSSION

In the present study, two strains, LGPC2 and LGPC7, isolated from healthy oyster hemolymph, displayed inhibitory activity against the *Vibrio splendidus*-related strain 32. LGPC7 belongs to the *Pseudomonas* genus which has already been associated with studies on probiotics against animal or plant pathogens (9, 40, 21, 23, 25). However, LGPC2 exerted the strongest *in vitro* inhibition toward *V. splendidus*-related strain 32 and was thus selected for this study. Biochemical tests and phylogenetic analysis based on 16S sequence led to the identification of LGPC2 as *Pseudoalteromonas* sp. This genus has been recently created following analysis, based on 16S rDNA gene, of the phylogenetic relationships among strains of the genus *Alteromonas*, *Shewanella* and *Moritella* (17). The phylogenetic analysis based on 16S sequences revealed that LGPC2 is closely related to the unidentified strains R7076 (42) and Ang.RO2 (5), and to the species *Pseudoalteromonas prydzensis* (10), *Pseudoalteromonas mariniglutinosa* (53) and *Pseudoalteromonas porphyrae* (species without published description to our knowledge) with more than 97 % sequence homologies (Figure 1). So far, no biological activity has been assessed or described for these species and strains.

Competition for iron is one of the mechanisms of action often described for probiotic strains: the produced siderophores, with strongest ferric ion affinity, chelate the ambient iron and thus inhibit the pathogen growth. It has been shown with *Vibrio* strains as targets and *Vibrio*, *Bacillus* or *Pseudomonas* strains as probiotics (16, 23, 47, 58). Moreover, siderophores with a

very high ferric ion affinity have been described within the *Pseudoalteromonas/Alteromonas* group (48). Thus, the hypothesis of an influence of iron and siderophores on the antagonism between LGPC2 and strain 32 was tested. However, the supplementation of the culture medium with iron did not influence the inhibitory activity of LGPC2, thus excluding any iron influence on the antagonistic activity. Indeed, in studies on inhibitory activities supported by siderophores, the supplementation of the medium with ferric ion decreased the inhibition (22, 47).

The molecular mass of the inhibitory molecule was estimated at less than 1 kDa. Its activity does not rely on a proteinous or saccharidic fraction and it is heat stable. Many *Pseudoalteromonas* strains produce a variety of biologically active substances (24). Antibacterial substances produced by these bacteria are either relatively large proteic or saccharidic molecules (6, 32, 41) or small molecules such as protease inhibitors (26-28) or brominated compounds (18, 30). Thus, due to its small size, the closest substance to the one produced by LGPC2 would be brominated compounds. However, the inhibitory spectrum is quite different (30) since the substance produced by LGPC2 only inhibited the growth of Gram-negative strains belonging to the genera *Escherichia*, *Shigella* and *Vibrio*.

In coculture experiments, strain LGPC2 strongly inhibited strain 32 growth as long as its initial concentration was above strain 32. Many studies *in vitro* and *in vivo* show that the probiotic strain does not display any inhibitory activity when its concentration is similar or inferior to the target strain (11, 16, 23, 46). Both coculture and supernatant experiments demonstrated a bactericidal action of LGPC2 since strain 32 concentration drastically decreased after contact with LGPC2 cells or culture supernatant. Strain 32 concentration stayed stable in coculture with the non producing mutant strain NTG720 and strain 32 growth was similar in NTG720 supernatant or in M9GCNT. These two results indicated that LGPC2 inhibition toward strain 32 is not due to a competition phenomenon nor to a nutrient depletion of the media.

Several authors described potential probiotic strains active against a wide range of *Vibrio* strains and thus inducing a global decrease of the *Vibrionaceae* flora in the surrounding water or within the host (45, 50). Since most of the bacterial pathogens of aquatic animals belongs to the *Vibrio* genus and many *Vibrio* strains may express some kind of virulence (19), a probiotic strain active against the whole *Vibrio* genus may be useful to decrease the risk of mortality outbreaks in aquaculture. Since the inhibitory activity is due to an original

substance, it may thus be interesting for the eventual development of new antibacterial agents in veterinary medicine.

To our knowledge, this study is the first one dealing with antibacterial producing strains isolated from oyster hemolymph. In the present work, the isolation and characterisation of a strain biologically active against a wide range of *Vibrio* species has been described. Such a strain could be used as probiotic for aquacultural mollusc species. However, *in vivo* experiments should be carried out to evaluate this strain potential probiotic activity and its colonisation abilities for a long term use. Specific identification tools would be very helpful to follow the host or environment colonisation, to evaluate the distribution of this strain and its relationships with oysters. Eventually, the next step will be the elucidation of the structure of the inhibitory molecule.

REFERENCES

1. **Abraham, T. J., S. A. Shanmugam, A. Uma, R. Palaniappan, and K. Dhevaran.** 2001. Biocontrol of shrimp bacterial pathogens using penaeid larva associated bacterium, *Alteromonas* sp. *Journal of Aquaculture in the Tropics* **16**:11-22.
2. **Austin, B., and D. A. Austin.** 1999. Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish, 3rd revis. Ed. Praxis publishing, Springer, London, England.
3. **Austin, B., L. F. Stuckey, P. A. W. Robertson, I. Effendi, and D. R. W. Griffith.** 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases* **18**:93-96.
4. **Bachère, E.** 2003. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture. *Aquaculture* **227**:427-438.
5. **Barbieri, E., B. J. Paster, D. Hughes, L. Zurek, D. P. Moser, A. Teske, and M. L. Sogin.** 2001. Phylogenetic characterization of epibiotic bacteria in the accessory nidamental gland and egg capsules of the squid *Loligo pealei* (Cephalopoda: Loliginidae). *Environmental Microbiology* **3**:151-67.
6. **Barja, J. L., M. L. Lemos, and A. E. Toranzo.** 1989. Purification and characterization of an antibacterial substance produced by a marine *Alteromonas* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33**:1674-9.
7. **Bedier, E., J. C. Cochard, G. Le Moullac, and J. Patrois.** 1998. Selective breeding and pathology in penaeid shrimp culture: the genetic approach to pathogen resistance. *World Aquaculture* **29**:46-51.
8. **Borrego, J. J., D. Castro, A. Luque, C. Paillard, P. Maes, M. T. Garcia, and A. Ventosa.** 1996. *Vibrio tapetis* sp., nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**:480-484.
9. **Boruah, H. P., and B. S. Kumar.** 2002. Biological activity of secondary metabolites produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Folia Microbiologica* **47**:359-63.
10. **Bowman, J. P.** 1998. *Pseudoalteromonas prydzensis* sp. nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium from Antarctic sea ice. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48 Pt 3**:1037-41.
11. **Duffes, F., F. Leroi, P. Boyaval, and X. Dousset.** 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* **47**:33-42.
12. **Egan, S., C. Holmstrom, and S. Kjelleberg.** 2001. *Pseudoalteromonas ulvae* sp. nov., a bacterium with antifouling activities isolated from the surface of a marine alga. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**:1499-504.
13. **Egan, S., T. Thomas, C. Holmstrom, and S. Kjelleberg.** 2000. Phylogenetic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from the marine alga *Ulva lactuca*. *Environmental Microbiology* **2**:343-7.
14. **Egidius, E.** 1987. Vibriosis: Pathogenicity and pathology. A review. *Aquaculture* **67**:15-28.
15. **Elston, R., and L. Leibovitz.** 1980. Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oysters, *Crassostrea virginica*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **37**:964-978.

16. **Gatesoupe, F. J.** 1997. Sidephore production and probiotic effect of *Vibrio* associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. Aquatic Living Resources **10**:239-246.
17. **Gauthier, G., M. Gauthier, and R. Christen.** 1995. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. International Journal of Systematic Bacteriology **45**:755-61.
18. **Gauthier, M. J., and G. N. Flatau.** 1976. Antibacterial activity of marine violet-pigmented *Alteromonas* with special reference to the production of brominated compounds. Canadian Journal of Microbiology **22**:1612-9.
19. **Gay, M., F. C. Berthe, and F. Le Roux.** 2004. Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Diseases of Aquatic Organisms **59**:49-56.
20. **Gay, M., T. Renault, A. M. Pons, and F. Le Roux.** In Press. Two *Vibrio splendidus*-related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. Diseases of Aquatic Organisms.
21. **Gibson, L. F., J. Woodworth, and A. M. George.** 1998. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. Aquaculture **169**:111-120.
22. **Gram, L., and J. Melchiorson.** 1996. Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas* sp. and *Shewanella putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue. Journal of Applied Bacteriology **80**:589-95.
23. **Gram, L., J. Melchiorson, B. Spanggaard, I. Huber, and T. F. Nielsen.** 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. Applied and Environmental Microbiology **65**:969-73.
24. **Holmstrom, C., and S. Kjelleberg.** 1999. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. FEMS Microbiology Ecology **30**:285-293.
25. **Holmstrom, K., and L. Gram.** 2003. Elucidation of the *Vibrio anguillarum* genetic response to the potential fish probiont *Pseudomonas fluorescens* AH2, using RNA-arbitrarily primed PCR. Journal of Bacteriology **185**:831-42.
26. **Imada, C., M. Maeda, S. Hara, N. Taga, and U. Simidu.** 1986. Purification and characterization of subtilisin inhibitors "Marinostatin" produced by marine *Alteromonas* sp. Journal of Applied Bacteriology **60**:469-476.
27. **Imada, C., M. Maeda, and N. Taga.** 1985. Purification and characterization of the protease inhibitor "monastatin" from a marine *Alteromonas* sp. with reference to inhibition of the protease produced by a bacterium pathogenic to fish. Canadian Journal of Microbiology **31**:1089-1094.
28. **Imada, C., U. Simidu, and N. Taga.** 1985. Isolation and characterization of marine bacteria producing alkaline protease inhibitor. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries **51**:799-803.
29. **Irianto, A., and B. Austin.** 2002. Probiotics in aquaculture. Journal of Fish Diseases **25**:633-642.
30. **Isnansetyo, A., and Y. Kamei.** 2003. MC21-A, a bactericidal antibiotic produced by a new marine bacterium, *Pseudoalteromonas phenolica* sp. nov. O-BC30(T), against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **47**:480-8.
31. **Ivanova, E. P., T. Sawabe, A. M. Lysenko, N. M. Gorshkova, V. I. Svetashev, D. V. Nicolau, N. Yumoto, T. Taguchi, S. Yoshikawa, R. Christen, and V. V. Mikhailov.** 2002. *Pseudoalteromonas ruthenica* sp. nov., isolated from marine invertebrates. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **52**:235-40.
32. **James, S. G., C. Holmstrom, and S. Kjelleberg.** 1996. Purification and characterization of a novel antibacterial protein from the marine bacterium D2. Applied and Environmental Microbiology **62**:2783-8.
33. **Joeborn, A., J. C. Olsson, A. Westerdahl, P. L. Conway, and S. Kjelleberg.** 1997. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1. Journal of Fish Diseases **20**:383-392.
34. **Kalinovskaya, N. I., E. P. Ivanova, Y. V. Alexeeva, N. M. Gorshkova, T. A. Kuznetsova, A. S. Dmitrenok, and D. V. Nicolau.** 2004. Low-molecular-weight, biologically active compounds from marine *Pseudoalteromonas* species. Current Microbiology **48**:441-6.
35. **Lacoste, A., F. Jalabert, S. Malham, A. Cuff, F. Gelebart, C. Cordevant, M. Lange, and S. A. Poulet.** 2001. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). Diseases of Aquatic Organisms **46**:139-145.
36. **Lambert, C., J. L. Nicolas, V. Cilia, and S. Corre.** 1998. *Vibrio pectenecida* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. International Journal of Systematic Bacteriology **48 Pt 2**:481-7.

37. **Le Roux, F., M. Gay, C. Lambert, J. L. Nicolas, M. Gouy, and F. Berthe.** 2004. Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences. *Diseases of Aquatic Organisms* **58**:143-50.
38. **Le Roux, F., M. Gay, C. Lambert, M. Waechter, S. Poubalanne, B. Chollet, J. L. Nicolas, and F. Berthe.** 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus* related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic Living Resources* **15**:251-258.
39. **Lee, S. O., J. Kato, N. Takiguchi, A. Kuroda, T. Ikeda, A. Mitsutani, and H. Ohtake.** 2000. Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:4334-9.
40. **Lottmann, J., H. Heuer, J. de Vries, A. Mahn, K. Doring, W. Wackernagel, K. Smalla, and G. Berg.** 2000. Establishment of introduced antagonistic bacteria in the rhizosphere of transgenic potatoes and their effect on the bacterial community. *FEMS Microbiology Ecology* **33**:41-49.
41. **McCarthy, S. A., R. M. Johnson, and D. Kakimoto.** 1994. Characterization of an antibiotic produced by *Alteromonas luteoviolacea* Gauthier 1982, 85 isolated from Kinko Bay, Japan. *Journal of Applied Bacteriology* **77**:426-32.
42. **Mergaert, J., A. Verhelst, M. C. Cnockaert, T. L. Tan, and J. Swings.** 2001. Characterization of facultative oligotrophic bacteria from polar seas by analysis of their fatty acids and 16S rDNA sequences. *Systematic and Applied Microbiology* **24**:98-107.
43. **Milagres, A. M., A. Machuca, and D. Napoleao.** 1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods* **37**:1-6.
44. **Miranda, C. D., and R. Zemelman.** 2002. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. *The Science of The Total Environment* **293**:207-218.
45. **Moriarty, D. J. W.** 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* **164**:351-358.
46. **Portrait, V., S. Gendron-Gaillard, G. Cottenceau, and A. M. Pons.** 1999. Inhibition of pathogenic *Salmonella enteritidis* growth mediated by *Escherichia coli* microcin J25 producing strains. *Canadian Journal of Microbiology* **45**:988-94.
47. **Pybus, V., M. W. Loutit, I. L. Lamont, and J. R. Tagg.** 1994. Growth inhibition of the salmon pathogen *Vibrio ordalii* by a siderophore produced by *Vibrio anguillarum* strain VL4355. *Journal of Fish Diseases* **17**:311-324.
48. **Reid, R. T., D. H. Live, D. J. Faulkner, and A. Butler.** 1993. A siderophore from a marine bacterium with an exceptional ferric ion affinity constant. *Nature* **366**:455-8.
49. **Rengpipat, S., A. Tunyanun, A. W. Fast, S. Piyatiratitivorakul, and P. Menasveta.** 2003. Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. *Diseases of Aquatic Organisms* **55**:169-173.
50. **Rico-Mora, R., D. Voltolina, and J. A. Villaescusa-Celaya.** 1998. Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) cultures. *Aquacultural Engineering* **19**:1-6.
51. **Riquelme, C., G. Hayashida, R. Araya, A. Uchida, M. Satomi, and Y. Ishida.** 1996. Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. *Journal of Shellfish Research* **15**:369-374.
52. **Robert, R., and A. Gerard.** 1999. Bivalve hatchery technology: the current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquatic Living Resources* **12**:121-130.
53. **Romanenko, L. A., N. V. Zhukova, A. M. Lysenko, V. V. Mikhailov, and E. Stackebrandt.** 2003. Assignment of '*Alteromonas marinoglutinosa*' NCIMB 1770 to *Pseudoalteromonas marinoglutinosa* sp. nov., nom. rev., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**:1105-9.
54. **Ruiz, C. M., G. Roman, and J. L. Sanchez.** 1996. A marine bacterial strain effective in producing antagonisms of other bacteria. *Aquaculture International* **4**:289-291.
55. **Sambrook.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor, N.Y.
56. **Schmidt, A. S., M. S. Bruun, I. Dalsgaard, and J. L. Larsen.** 2001. Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:5675-82.
57. **Schwyn, B., and J. B. Neilands.** 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* **160**:47-56.
58. **Sugita, H., Y. Hirose, N. Matsuo, and Y. Deguchi.** 1998. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture* **165**:269-280.

59. **Sugumar, G., T. Nakai, Y. Hirata, D. Matsubara, and K. Muroga.** 1998. *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* **33**:111-8.
60. **Thompson, J. D., F. Plewniak, J. Thierry, and O. Poch.** 2000. DbClustal: rapid and reliable global multiple alignments of protein sequences detected by database searches. *Nucleic Acids Research* **28**:2919-26.
61. **Van de Peer, Y., and R. De Wachter.** 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Applications in Biosciences* **10**:569-70.
62. **Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos, and W. Verstraete.** 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**:655-71.
63. **Villamil, L., A. Figueras, M. Planas, and B. Novoa.** 2003. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture* **219**:1-4.
64. **Wachter, M., F. Le Roux, J.-L. Nicolas, E. Marissal, and F. Berthe.** 2002. Caractérisation de bactéries pathogènes de naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Comptes Rendus Biologies* **325**:231-238.

- Discussion -

A ce jour, les traitements disponibles ne sont pas applicables pour les élevages de mollusques en milieu ouvert. Les mesures prophylactiques, telles que la sélection génétique et/ou l'adaptation des pratiques culturales, sont donc les seuls moyens de lutte disponibles (Grizel, 1997). Celles-ci ne peuvent être mises en place qu'après l'acquisition de connaissances sur les interactions hôte-pathogène-environnement et les mécanismes régulateurs de ces interactions. Cette étude, visant à développer une infection expérimentale chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, s'intègre dans cette approche.

I - Sélection de souches virulentes

La première étape de ce travail a consisté à établir une collection de souches de *Vibrio* potentiellement virulents, à partir de lots d'huîtres subissant des épisodes de mortalités estivales. Nous avons choisi d'analyser ces épisodes par expérimentation de cohabitation. Ceci a permis de sélectionner les événements transmissibles en condition expérimentale. Le suivi quotidien des animaux et le relevé des mortalités ont permis de prélever des individus pour analyse de leur flore *Vibrionaceae* dès qu'ils présentaient une faiblesse du muscle adducteur. En effet, en ce qui concerne les mollusques d'intérêt aquacole cultivés dans la zone intertidale, les résultats des analyses effectuées directement à partir de prélèvements sur le terrain peuvent être biaisés par des prélèvements tardifs survenant à la fin de l'épisode de mortalité, les lots n'étant pas toujours accessibles (coefficient de marées).

Sur les douze lots traités en cohabitation, neuf ont engendré des mortalités dans le lot d'huîtres saines (lot S) mises en contact avec des huîtres issues du lot subissant un épisode de mortalité (lot M). Les trois autres lots traités n'ont engendré que très peu ou pas de mortalités dans le lot S. Dans un de ces trois cas, les huîtres du lot M n'ont plus exprimé aucune mortalité une fois en structure expérimentale, laissant supposer que le prélèvement avait été effectué de façon tardive. Dans les deux autres cas, les huîtres du lot M ont continué à exprimer des mortalités, laissant supposer soit que celles-ci n'étaient pas dues à un agent infectieux, soit que l'agent infectieux n'était pas transmissible dans ces conditions. En revanche, ces résultats montrent que dans le cas où des mortalités ont été observées dans le lot S, elles n'étaient pas

dues aux conditions confinées d'expérimentation mais bien à un élément transmissible présent dans certaines huîtres issues de lots subissant des épisodes de mortalités estivales.

Des travaux antérieurs (J.L. Nicolas, comm. pers.) ont mis en évidence qu'une augmentation de la flore *Vibrionaceae* dans l'hémolymphe des huîtres précédait les épisodes de mortalités estivales. C'est pourquoi nous avons établi la collection de souches à partir d'hémolymphe d'huîtres baillantes. Ceci nous a permis d'éliminer les bactéries commensales de la glande digestive (Prieur, 1981 ; Kueh & Chan, 1985). La constitution de la collection a été basée sur une approche qualitative (isolement de trois colonies de chaque type morphologique), le but étant d'isoler une part importante de la diversité des souches présentes dans l'hémolymphe des huîtres moribondes, ce sans notion quantitative de souche majoritaire.

L'analyse phylogénétique basée sur le gène *gyrB* montre une certaine diversité génétique au sein de la collection, des flores différentes ayant été isolées des six épisodes de mortalité traités. La majorité des souches isolées des cohabitations et des témoins négatifs appartient au groupe polyphylétique de *Vibrio splendidus* (69/104).

La sensibilité de la palourde et de l'huître vis-à-vis d'une collection de souches phénotypiquement proches de *V. splendidus* a été précédemment évaluée (Gay, 2001). Les plus forts taux de mortalité ont été obtenus après injection dans le muscle adducteur sur des lots de palourdes. De ce fait, une présélection des souches virulentes a été effectuée sur des palourdes. En raison du nombre élevé de souches à analyser, elles ont été regroupées par expérimentation de cohabitation, par trois, quatre ou cinq. Parmi les trente et un groupes de souches testés, certains n'induisent pas ou peu de mortalités sur l'huître et la palourde, certains sont pathogènes pour les palourdes et pour les huîtres, alors que d'autres induisent des mortalités uniquement chez les palourdes ou uniquement chez les huîtres. Ces résultats nous laissent supposer que les mécanismes de virulence impliqués sont au moins partiellement différents. Les souches des groupes ayant induit des mortalités chez l'huître ont été testées en infection expérimentale en individuel et par deux. Sur les seize souches testées en individuel, deux ont induit des taux de mortalité supérieurs à 50 %. Parmi les vingt quatre couples de souches testés, nous avons observé trois types de phénomène (Figure 3 de l'article 1) : soit le taux de mortalité induit par les deux souches est du même ordre que ceux induits par ces souches en individuel ; soit le taux de mortalité induit par les deux souches est supérieur à ceux induits par chacune des souches ; soit le taux de mortalité induit par les deux souches est inférieur à ceux induits par chacune des souches.

Ainsi, des interactions positives (collaboration) ou négatives (antagonisme) ont été observées entre certaines souches. Des phénomènes de collaboration entre bactéries pathogènes ont déjà été décrits dans la littérature, particulièrement pour des infections gastro-intestinales, des péritonites ou des infections de type parodontite chez l'homme (Onderdonk et al., 1976 ; Rotstein et al., 1989a ; Rotstein et al., 1989b ; Ebersole et al., 1995). Différentes hypothèses ont été émises sur les mécanismes de ces interactions : production, par une souche, de composés facilitant la croissance, la pénétration ou la colonisation de l'autre souche (Mergehagen et al., 1958 ; MacDonald et al., 1963 ; Rotstein et al., 1989b) ; utilisation de l'oxygène par une souche anaérobie facultative permettant la croissance d'une souche anaérobie stricte (Onderdonk et al., 1976). Les interactions observées entre souches de *Vibrio* dans ce travail représentent, à notre connaissance, le premier cas de collaboration entre bactéries du même genre, et le premier cas impliquant le genre *Vibrio*. Ces phénomènes de collaboration laissent supposer que ces bactéries, proches d'un point de vue génomique, possèdent chacune un ou plusieurs mécanismes de virulence spécifiques dont l'expression renforcerait leur pathogénicité.

Le génotypage de cette collection de souches montre qu'il n'y a pas de relation entre l'affiliation taxonomique et la pathogénicité. En effet, au sein d'un clade défini par l'analyse phylogénétique, les souches présentent une virulence variable, les souches induisant des mortalités n'appartenant pas toutes à la même espèce (groupe de *V. splendidus*, *V. aestuarianus*, *Vibrio* sp.), résultats concordants avec nos précédentes études (Le Roux et al., 2002).

II - Etude des souches 31 et 32

Les résultats de quatre infections expérimentales par injection dans le muscle adducteur des souches 31 et/ou 32 montrent que le taux de mortalité induit par le couple 31+32 est significativement supérieur à celui induit par les souches 31 et 32 inoculées en individuel. Ce couple de souches a donc été sélectionné pour le reste de l'étude.

La description des altérations tissulaires et cellulaires constitue la première étape dans la compréhension des mécanismes intervenant dans la relation entre *C. gigas* et les souches 31 et/ou 32. Deux approches ont été employées. Les lésions tissulaires après infection expérimentale par les souches 31 et/ou 32 ont été étudiées en microscopie photonique et microscopie électronique à transmission. Les interactions entre les souches 31 et/ou 32 et les hémocytes, effecteurs du système immunitaire, ont été analysées en cytométrie en flux.

L'analyse histologique d'animaux issus d'infection expérimentale par 31 et/ou 32 montre que les altérations tissulaires et les localisations des bactéries sont identiques après injection des bactéries dans le muscle adducteur ou dans la cavité palléale.

Suite à l'inoculation des souches 31 et/ou 32, les bactéries sont présentes à la périphérie du muscle adducteur, alors que l'organe tout entier présente des lésions. Plusieurs hypothèses peuvent être émises sur cette localisation : l'action des bactéries est due à une toxine excrétée et de ce fait ne nécessite pas la présence des bactéries sur le site de la lésion (Moore et al., 2001 ; Friedman et al., 2002) ; les densités bactériennes peuvent être trop faibles pour être détectées en microscopie photonique (Cadavid et al., 2000) ; les bactéries agissent sur un autre tissu (système circulatoire ou nerveux), le muscle étant alors altéré de manière indirecte (Dastur & Daver, 1980 ; Stevens, 2000) ; enfin, les lésions peuvent être dues à une réponse de l'hôte (Hatzizisis et al., 2000 ; Saouda et al., 2001 ; Sharma & Anker, 2002 ; Sun et al., 2003). Après infection expérimentale par les souches 31 et/ou 32, le muscle adducteur est le seul organe présentant systématiquement des altérations. Les différents types de lésions observées pourraient représenter une succession d'événements (Figure 4 de l'Article 2). Chez la majorité des individus, aucune inflammation n'était associée aux altérations. Cependant, chez certains individus, une intense inflammation a été observée au sein des faisceaux musculaires, ceux-ci contenant des cellules dont le contenu cytoplasmique était très condensé. On peut supposer qu'il s'agit d'un phénomène de cicatrisation ou d'élimination des débris cellulaires (Ford et al., 1993). Des altérations des tissus musculaires lors de vibrioses (Bruno et al., 1986 ; Egidius, 1987 ; Li et al., 1998) ou lors d'autres infections d'animaux aquatiques (Eldar et al., 1999 ; Miyazaki et al., 1999 ; Miyazaki et al., 2000 ; Abella et al., 2003 ; Chen et al., 2003) ont été précédemment décrites. Cependant, ces altérations semblent généralement d'ordre secondaire et/ou sont dues à des attaques non spécifiques (ulcères de la peau, infections de blessure) (Dastur & Daver, 1980 ; Schaible et al., 1989 ; Ling et al., 2000 ; Hund, 2001). Dans le cas des souches 31 et 32, aucun autre organe n'est apparu altéré en microscopie photonique. De plus, les lésions du muscle adducteur peuvent être associées à la faiblesse de cet organe, seule altération macroscopique observée chez les animaux issus des épisodes de mortalités estivales ou des cohabitations.

Lorsque les hémocytes sont mis en contact avec les souches 31 et/ou 32, une partie des hémocytes (la population "C") présente des modifications structurales se traduisant par une augmentation de la complexité. Ce phénomène n'est pas simplement dû à la présence de bactéries puisqu'il n'est pas observé pour les cellules en contact avec la souche 125, non

pathogène. Les observations des cellules après cyto centrifugation montrent que cette modification n'est pas non plus due à un phénomène de phagocytose. En effet, le taux de cellules ayant phagocyté des bactéries est supérieur en présence de la souche 125 dans l'expérimentation 2, en présence de la souche 32 dans l'expérimentation 3 et en présence des souches 32, 125 et du couple 31+32 dans l'expérimentation 4, alors que le pourcentage de cellules de la population "C" est peu variable entre les expérimentations. Malgré de fortes différences entre expérimentations, le taux de cellules ayant phagocyté des bactéries est le seul critère présentant des différences pour les souches 31 et/ou 32. Cependant, la quantité de bactéries phagocytées par cellule n'a pas été déterminée, ce paramètre pourrait être évalué par d'autres méthodes, telles que le marquage de bactéries et l'analyse des hémocytes en cytométrie en flux. Les souches 31 et/ou 32 ont un effet significatif sur la mortalité hémocytaire. Pour les quatre expérimentations réalisées avec un contact bactéries/hémocytes de 5-6 h, les taux de mortalité hémocytaire induits par les souches 31 et/ou 32 sont inférieurs à 10 %, mais sont significativement supérieurs à ceux induits par la souche 125 et par l'EDMAS. En revanche, quand le temps de contact est de 12 h, les taux atteignent 12 à 14 % pour les souches 31 et/ou 32, résultats toujours significativement différents de ceux pour la souche 125 ou pour l'EDMAS. Cependant, à ce jour, des temps de contact supérieurs ne sont pas envisageables. En effet, la flore de l'hémolymphe et les bactéries mises en contact se développent alors et biaisent les résultats.

Certains des paramètres évalués au cours de ce travail ont présenté une importante variabilité entre expérimentations. Ainsi, le taux de mortalité à trois jours après injection dans le muscle adducteur du couple 31+32 (10^7 UFC.mL⁻¹) variait suivant les expérimentations de 10 à 60 % pour des huîtres issues de captage naturel. De même, les résultats obtenus en cytométrie en flux pour les taux de mortalité hémocytaire et les taux de cellules ayant phagocyté des bactéries présentent une forte variabilité entre expérimentations. En revanche, il est intéressant de noter que le taux de cellules appartenant à la population "C" ne varie pas ou peu pour une condition donnée entre les différentes expérimentations.

L'étude sur l'influence de facteurs intrinsèques à l'hôte a montré que des facteurs génétiques et physiologiques intervenaient dans l'issue des infections expérimentales. Les huîtres utilisées dans la majorité des infections expérimentales provenaient de captage naturel et étaient élevées en milieu ouvert en zone intertidale. Les événements subis par les animaux avant les infections expérimentales (fortes variations de température, salinité, hypoxie, polluants, bloom phytoplanctonique, pathogènes...) sont donc inconnus. Or, d'importantes variations des

mécanismes de défense (activités bactéricides de l'hémolymphe, concentration hémocytaire, activités lysosomiales) en fonction de facteurs environnementaux tels que les saisons ou la présence de polluants ont été observés (Genthner et al., 1999 ; Oliver et al., 2003). Il est donc probable que la variabilité observée entre expérimentations est due pour une grande part à des différences d'état physiologique des individus. De nombreuses études ont décrit la réponse de *C. gigas* (taux d'hormones de stress, expression de gènes) suite à des contaminations ou manipulations expérimentales (Lacoste et al., 2001d ; c ; Lacoste et al., 2002 ; Boutet et al., 2003 ; Boutet et al., 2004). La validité de ces marqueurs n'a cependant pas été testée en conditions naturelles. Il est donc aujourd'hui difficile de déterminer *a priori* les événements qu'un lot d'huîtres a subis ainsi que son état physiologique.

On peut supposer que de telles variations dans la réponse aux infections expérimentales seront observées tant que des animaux venant du milieu non contrôlé seront utilisés. Le développement ou l'aménagement de structures pour obtenir et/ou maintenir des animaux dans des conditions contrôlées et standardisées pourrait permettre de réduire cette variabilité. Cependant, peu de données étant disponibles sur les facteurs modifiant les mécanismes de défense et l'état physiologique chez *C. gigas*, il est difficile de déterminer quels sont les facteurs à contrôler en priorité. Le principal frein au développement de telles structures est le contrôle de la flore bactérienne puisqu'il n'est pas envisageable d'éliminer la totalité de la flore bactérienne de l'eau de mer et/ou de maintenir des animaux axéniques après leur métamorphose. D'autre part, contrairement à d'autres interactions hôte-pathogène, il est actuellement impossible d'obtenir des huîtres IOPS (indemnes d'organismes pathogènes spécifiques) pour les souches de *Vibrio* pathogènes étant donné qu'il n'existe pas à ce jour d'outils diagnostiques spécifiques pour différencier les souches de *Vibrio* virulentes des non virulentes et que les bactéries du genre *Vibrio* constituent la majeure partie de la flore commensale intestinale chez *C. gigas*.

III - Influence de l'hôte dans l'issue des infections expérimentales

Le déclenchement d'une maladie infectieuse est généralement influencé par des facteurs environnementaux et/ou par des facteurs intrinsèques à l'hôte et au pathogène (Snieszko, 1974). Au cours de cette étude, nous avons évalué, chez *C. gigas*, l'influence de deux facteurs intrinsèques à l'hôte, l'un génétique, l'autre physiologique dans l'issue des infections par des souches de *Vibrio*.

L'influence de facteurs génétiques a déjà été observée dans d'autres interactions entre les huîtres et des agents pathogènes (Beattie, 1985 ; Lapègue et al., 2003). L'infection expérimentale de familles biparentales par des souches de *Vibrio* réalisée au cours de la présente étude laisse supposer qu'une base génétique et/ou des facteurs parentaux épigénétiques pourraient intervenir dans la susceptibilité de *C. gigas* à des souches de *Vibrio* pathogènes. En effet, les taux de mortalité des familles varient de 3 à 70 % après injection du groupe de souches virulentes. Ces différences pourraient être dues à des stratégies de défense différentes ou à des taux différentiels de certaines substances impliquées dans la réponse immunitaire. Ainsi, chez *Ostrea edulis*, des familles issues de parents tolérants ou sensibles au parasite *Bonamia ostreae* présentent des réponses immunitaires différentielles (activités estérasiques et production de radicaux oxygénés) et une répartition différente des types hémocytaires (pourcentage de cellules agranuleuses) (Besnard-Cochennec, 2001). D'autre part, il a été mis en évidence que la différence de tolérance vis-à-vis du parasite *Perkinsus marinus* pour les espèces *Crassostrea virginica* et *C. gigas* est due à la production d'inhibiteurs de protéases et d'hémagglutinines (Romestand et al., 2002).

Les familles biparentales utilisées dans cette étude avaient été classées "résistantes" ou "sensibles" aux épisodes de mortalités estivales en fonction des taux de mortalité observés sur le terrain dans le cadre du programme Morest (Dégremont, 2003 ; Samain et al., 2003). Les taux de mortalité obtenus en infection expérimentale ne sont pas corrélés avec ceux observés pour ces mêmes familles sur le terrain. Ce résultat est en accord avec une étiologie plurifactorielle des épisodes de mortalités estivales et avec l'hypothèse selon laquelle plusieurs cascades d'événements pourraient être regroupées sous le terme mortalités estivales. D'autre part, ce résultat montre que la classification des familles en "sensible" ou "résistante" ne résulte pas ou pas uniquement d'une sélection basée sur la sensibilité à des souches de *Vibrio* pathogènes.

Pendant la maturation sexuelle, l'huître creuse consacre une grande partie de son énergie à la production de gamètes, ce qui peut engendrer un affaiblissement de l'animal. Ainsi, plusieurs études ont décrit cet état physiologique comme un des facteurs prépondérants dans des épisodes de mortalité (Imai et al., 1965 ; Mori et al., 1965 ; Soletchnik et al., 1999). Au cours de cette étude, nous avons évalué l'effet de la maturation sexuelle sur l'infection expérimentale par des souches de *Vibrio* pathogènes. Pour cela, nous avons utilisé des lots d'huîtres ayant subi différents conditionnements trophiques.

En 2002, Les huîtres de la condition trophique CN1 (quantité de nourriture la plus faible) ont subi les plus faibles taux de mortalité et présentaient un bilan énergétique positif, indiquant que ces animaux utilisaient l'énergie assimilée pour leur système de défense, la croissance somatique et la gamétogénèse. En revanche, les huîtres de la condition trophique CN3 (quantité de nourriture la plus importante) ont subi les plus forts taux de mortalité et présentaient un bilan énergétique négatif indiquant que ces animaux devaient puiser dans leurs réserves pour maintenir leur métabolisme de base. Par ailleurs, les huîtres issues de la condition CN3 ont fourni le plus gros effort de reproduction, avec une maturation plus précoce et des gonades hypertrophiées. Ces résultats laissent supposer que les différences de sensibilité des huîtres aux souches de *Vibrio* pathogènes sont associées à leurs bilans énergétiques, eux mêmes liés à la maturation sexuelle.

En 2003, l'infection expérimentale a été effectuée 48 h après la ponte. Aucune différence n'a été observée entre les différentes conditions trophiques. Des études antérieures ont montré que les huîtres à un stade de maturation avancée présentent un taux de filtration diminué et un bilan énergétique négatif. En revanche, les valeurs des taux de filtration redeviennent normales et le bilan énergétique positif moins de 48 h après la ponte, indiquant une récupération rapide des animaux (Soletchnik et al., 1997). Nos résultats laissent supposer que les mécanismes de défense sont également réactivés rapidement après la ponte.

IV - Sélection de souches inhibitrices

Peu de moyens de lutte contre les bactéries pathogènes sont disponibles pour les mollusques d'intérêt aquacole. De nombreuses souches bactériennes probiotiques ont fait l'objet d'études allant parfois jusqu'aux essais *in vivo* dans des structures d'élevage aquacole (Moriarty, 1998 ; Riquelme et al., 2001). Les souches actives ont été généralement sélectionnées à partir de l'hôte lui-même ou de son environnement. Gatesoupe (1999) suggère que des souches inhibitrices naturellement présentes chez l'hôte pourraient plus facilement le coloniser.

Ainsi, nous avons utilisé la souche 32 comme souche cible pour étudier les activités inhibitrices de la flore bactérienne d'huîtres. Des essais préliminaires n'ont pas permis d'isoler de souche inhibitrice de la chair d'huîtres. En revanche, des souches inhibitrices ont été observées dans la flore bactérienne de l'hémolymphe. La sélection des souches a donc été effectuée à partir de cette dernière. Deux souches Gram négatif, inhibitrices de la souche 32 proche de *V. splendidus*, ont été isolées par la méthode de filtration sur membrane HGMF. L'une de ces souches, LGPC7, appartient au genre *Pseudomonas* et l'autre, LGPC2, au genre

Pseudoalteromonas. La souche LGPC2 présentant la plus grande activité inhibitrice, elle a été sélectionnée pour cette étude.

De nombreuses espèces du genre *Pseudoalteromonas* produisent des composés antibiotiques (Holmstrom & Kjelleberg, 1999 ; Egan et al., 2001 ; Hentschel et al., 2001 ; Isnansetyo & Kamei, 2003). Cependant, la molécule antibiotique produite par la souche LGPC2 présente des caractéristiques différentes des molécules précédemment décrites. En effet, il s'agit d'une molécule de petite taille (< 1kDa), thermostable à 100 °C, dont la fraction active n'est pas de nature protéique ou saccharidique, alors que la plupart des substances actives du genre *Pseudoalteromonas* sont des protéines de taille supérieure à 50 kDa (Barja et al., 1989 ; McCarthy et al., 1994 ; James et al., 1996). Les seuls produits présentant une masse moléculaire faible (1-2 kDa) sont des composés bromés (Gauthier & Flatau, 1976 ; Isnansetyo & Kamei, 2003). Cependant, ces substances sont majoritairement actives contre des bactéries Gram positif (*Staphylococcus* et *Enterococcus*) alors que l'activité inhibitrice de la souche LGPC2 s'exerce vis-à-vis de souches appartenant aux familles des *Enterobacteriaceae* et des *Vibrionaceae*. Ainsi, l'activité inhibitrice de la souche de *Pseudoalteromonas* LGPC2 est due à la sécrétion d'une molécule originale.

L'activité inhibitrice de LGPC2 vis-à-vis de la souche 32 a été évaluée *in vitro* par des expérimentations de cocultures et par l'étude de l'effet de son surnageant de culture sur la survie et/ou la croissance de la souche 32. Cette activité est bactéricide. En effet, lors des expérimentations de cocultures, la souche sensible 32 n'est plus détectable dans le milieu après quelques heures, sauf si la concentration initiale de la souche 32 est supérieure ou équivalente à celle de la souche LGPC2. Des phénomènes comparables sont observés dans les expérimentations de cocultures décrites dans la littérature (Duffes et al., 1999 ; Gram et al., 1999 ; Portrait et al., 1999). La mise en culture de la souche 32 dans du surnageant de LGPC2 entraîne une diminution significative de sa concentration. En revanche, la concentration de la souche 32 reste stable dans les cocultures avec la souche mutante non productrice NTG720 et sa croissance est équivalente dans du surnageant de culture de la souche mutante non productrice NTG720 et dans du milieu M9GCNT. Les résultats obtenus avec la souche mutante non productrice NTG720 montrent que l'activité inhibitrice n'est due ni à un phénomène de compétition ni à une déplétion du milieu en nutriments.

La substance inhibitrice produite par la souche LGPC2 présente donc des caractéristiques intéressantes pour une éventuelle application puisqu'elle s'exerce vis-à-vis de nombreuses espèces de *Vibrio* pathogènes d'animaux aquatiques d'importance économique.

V - Implication de souches de *Vibrio* dans les épisodes de mortalités estivales

L'origine plurifactorielle des épisodes de mortalités estivales a été confirmée par les résultats obtenus dans le cadre du programme MOREST (Samain et al., 2003). A ce jour, les différents facteurs impliqués sont : la température ; la reproduction, avec un risque maximum dans la période précédant la ponte ; l'alimentation, avec le risque d'un bilan énergétique négatif en cas de trop grandes quantités de nourriture disponibles ; la génétique, avec une forte variabilité des taux de mortalité entre familles sur le terrain et enfin, le stress qui pourrait servir de facteur déclenchant.

Au cours de ce travail, pour trois des six épisodes de mortalités estivales étudiés, un groupe de souches pathogènes au moins a été identifié. Ces résultats nous laissent supposer qu'une implication de souches de *Vibrio* est probable au moins pour certains épisodes de mortalités estivales. Les souches induisant des mortalités en infection expérimentale n'appartiennent pas toutes à la même espèce : certaines sont regroupées avec des souches types du groupe polyphylétique de *V. splendidus*, d'autres avec la souche type de *V. aestuarianus* et enfin certaines ne sont regroupées avec aucune souche type. Ces résultats sont concordants avec ceux précédemment obtenus (Le Roux et al., 2002) : une seule souche ou espèce n'est pas à l'origine des épisodes de mortalités estivales.

Sur les seize souches testées en infection expérimentale en individuel, seules deux ont induit plus de 50 % de mortalité, cependant, toutes les souches de la collection n'ont pas été testées. En revanche, sur les vingt-quatre couples de souches testés, douze ont présenté des phénomènes de collaboration, entraînant des taux de mortalité supérieurs à ceux induits par les mêmes souches en individuel. De même, des phénomènes d'antagonisme ont été observés, avec pour conséquence un taux de mortalité inférieur à ceux induits par les mêmes souches en individuel. L'existence de ces interactions suggère que l'implication du genre *Vibrio* dans les épisodes de mortalités estivales devrait être évaluée en considérant la flore bactérienne de *C. gigas* dans sa totalité et non pas seulement la présence (majoritaire ou non) ou absence d'une souche donnée.

Les données obtenues au cours de ce travail nous laissent supposer que l'implication de souches de *Vibrio* dans les épisodes de mortalités estivales résulte d'un déséquilibre de la flore des huîtres. En effet, deux souches inhibant la croissance de souches de *Vibrio* ont été isolées

de l'hémolymph de huîtres. Celles-ci pourraient participer aux mécanismes de défense de l'animal en empêchant le développement de souches pathogènes. Leur absence suite à des modifications de l'environnement (milieu extérieur et/ou huître) pourrait entraîner l'apparition de mortalités. D'autre part, certaines des souches isolées des témoins négatifs ont induit de forts taux de mortalité en infection expérimentale. Deux hypothèses peuvent être émises sur la présence de ces souches chez ces témoins sans apparition de mortalités. La première est que ces bactéries étaient présentes en concentration faible chez les huîtres, trop faible pour induire des mortalités. La deuxième est qu'une ou plusieurs souches inhibitrices ou antagonistes pourraient avoir empêché la prolifération et/ou l'expression de la virulence de ces souches pathogènes. Concernant ce dernier point, l'impact de toute ou partie de la flore d'un organisme sur l'avènement d'une maladie a été décrit pour d'autres infections bactériennes. En effet, des changements d'alimentation ou la présence naturelle de souches inhibitrices peuvent entraîner la modification de la composition de la flore et favoriser ou empêcher le développement d'agents bactériens infectieux (Gatesoupe, 1997 ; Asikainen & Chen, 1999 ; Buddington & Weiher, 1999 ; Castro et al., 2002). Dans le cas de *C. gigas*, les interactions positives ou négatives entre souches, la prolifération et/ou l'expression de la virulence de souches potentiellement pathogènes sont probablement influencées par des facteurs environnementaux (Stretton & Goodman, 1998 ; Liu & Fletcher, 2001 ; Smirnova et al., 2001 ; Yoh et al., 2003) ou intrinsèques à l'hôte et résulteraient dans certains cas en l'apparition de mortalités. Des études en écologie microbienne sur la flore de lots d'huîtres avant, pendant et après les épisodes de mortalités estivales permettraient d'évaluer ces déséquilibres.

VI - Conclusions

La caractérisation de la collection de souches nous a permis d'émettre des hypothèses sur l'implication de souches de *Vibrio* dans les épisodes de mortalités estivales de *C. gigas*. Les interactions (collaboration, antagonisme et inhibition) observées entre souches remettent en cause les techniques souvent mises en œuvre lors de la recherche d'agents pathogènes bactériens : l'isolement d'une souche, l'aspect majoritaire de sa répartition et l'évaluation de sa virulence en infection expérimentale ne sont pas nécessairement suffisants pour statuer sur son implication dans la maladie. En effet, d'une part, les phénomènes de collaboration ne peuvent pas être mis en évidence dans le cadre d'une étude souche par souche, d'autre part, les résultats des infections expérimentales peuvent être biaisés par la présence, chez les animaux

inoculés, de souches limitant le développement et/ou l'expression de la virulence des souches testées.

La variabilité observée lors des infections expérimentales et lors de l'étude des interactions hémocytes-bactéries pourrait éventuellement être réduite en diminuant l'effet de facteurs environnementaux par l'utilisation d'animaux maintenus en structure expérimentale de leur naissance à leur utilisation. De même, la modulation de certains facteurs intrinsèques à l'huître pourrait permettre d'obtenir des animaux plus ou moins sensibles par la sélection de familles ou par le conditionnement trophique. Le contrôle de ces facteurs pourrait éventuellement permettre le développement de techniques d'infection expérimentale plus proches de l'infection naturelle (cohabitation, balnéation).

L'étude du couple 31+32 nous a permis d'observer la première maladie d'organes musculaires induite par des souches de *Vibrio*. D'autre part, ce travail constitue la première description des altérations tissulaires induites par des souches proches de *V. splendidus*, groupe fréquemment associé à des épisodes de mortalité d'animaux aquatiques. Les études en histopathologie et en cytométrie en flux visaient à décrire les altérations mais également à déterminer si ces souches, inoculées en individuel, induisent des lésions spécifiques. Les symptômes ou altérations observés sont similaires, que les souches soient présentes ensemble ou en individuel. Ces résultats semblent indiquer que certains mécanismes de virulence au moins sont communs à ces deux souches. L'utilisation de bactéries marquées (GFP, marquage chimique) et le suivi de l'évolution de la maladie permettront peut-être d'observer des altérations et/ou localisations spécifiques de chaque souche. L'analyse du génome de ces bactéries va également participer à l'identification des gènes de virulence de chacune des souches, le séquençage du génome complet de la souche 32 étant actuellement en cours (collaboration D. Mazel, Institut Pasteur). Par ailleurs, une soustraction génomique, effectuée entre les génomes des souches 31 et 32, a mis en évidence, chez chaque souche, la présence de gènes spécifiques, homologues de facteurs de virulence, dont la toxine RTX chez la souche 32 (Saulnier, comm. pers.).

L'infection expérimentale par le couple de souches 31+32 pourra également être utilisée dans le cadre d'approches intégratives impliquant pathologie, immunologie, physiologie, génétique et écotoxicologie, tel l'impact de polluants sur le système immunitaire de *C. gigas* (Gagnaire, comm. pers.) ou l'étude de l'implication de différents facteurs dans les phénomènes de mortalités estivales par reproduction en structure expérimentale.

-Bibliographie-

- Abella B. S., Kuchinic P., Hiraoka T., Howes D. S. (2003) Atraumatic Clostridial myonecrosis: case report and literature review. *Journal of Emergency Medicine* 24:401-405
- Actis L. A., Fish W., Crosa J. H., Kellerman K., Ellenberger S. R., Hauser F. M., Sanders-Loehr J. (1986) Characterization of anguibactin, a novel siderophore from *Vibrio anguillarum* 775(pJM1). *Journal of Bacteriology* 167:57-65
- Actis L. A., Potter S. A., Crosa J. H. (1985) Iron-regulated outer membrane protein OM2 of *Vibrio anguillarum* is encoded by virulence plasmid pJM1. *Journal of Bacteriology* 161:736-742
- Actis L. A., Tolmasky M. E., Crosa L. M., Crosa J. H. (1995) Characterization and regulation of the expression of FatB, an iron transport protein encoded by the pJM1 virulence plasmid. *Molecular Microbiology* 17:197-204
- Alcaide E. (2003) Numerical taxonomy of *Vibrionaceae* isolated from cultured amberjack (*Seriola dumerili*) and surrounding water. *Current Microbiology* 46:184-189
- Allam B., Ashton-Alcox K. A., Ford S. E. (2001) Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. clams. *Developmental and Comparative Immunology* 25:365-375
- Allam B., Ashton-Alcox K. A., Ford S. E. (2002) Flow cytometric measurement of hemocyte viability and phagocytic activity in the clam, *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Shellfish Research* 21:13-19
- Allam B., Paillard C., Auffret M. (2000) Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 76:63-69
- Alsina M., Blanch A. R. (1994a) Improvement and update of a set of keys for biochemical identification of *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology* 77:719-721
- Alsina M., Blanch A. R. (1994b) A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology* 76:79-85
- Anderson R. S., Patel K. M., Roesijadi G. (1999) Oyster metallothionein as an oxyradical scavenger: implications for hemocyte defense responses. *Developmental and Comparative Immunology* 23:443-449
- Anguiano-Beltran C., Searcy-Bernal R., Lizarraga-Partida M. L. (1998) Pathogenic effects of *Vibrio alginolyticus* on larvae and postlarvae of the red abalone *Haliotis rufescens*. *Diseases of Aquatic Organisms* 33:119-122
- Arumugan M., Romestand B., Torreilles J. (2000) Nitrite released in haemocytes from *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas* and *Ruditapes decussatus* upon stimulation with phorbol myristate acetate. *Aquatic Living Resources* 13:173-177

- Arzul I. (2001) Herpèsvirus infectant les bivalves marins : détection, génome et transmission. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 297 p
- Asikainen S., Chen C. (1999) Oral ecology and person-to-person transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology* 2000 20:65-81
- Austin B., Austin D. A. (1999) Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish, Vol. Praxis publishing, London, Springer, 457 p
- Austin B., Stuckey L. F., Robertson P. A. W., Effendi I., Griffith D. R. W. (1995) A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases* 18:93-96
- Bachère E. (2003) Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture. *Aquaculture* 227:427-438
- Balebona M. C., Morinigo M. A., Faris A., Krovacek K., Mansson I., Bordas M. A., Borrego J. J. (1995) Influence of salinity and pH on the adhesion of pathogenic *Vibrio* strains to *Sparus aurata* skin mucus. *Aquaculture* 132:113-120
- Banin E., Israely T., Kushmaro A., Loya Y., Orr E., Rosenberg E. (2000) Penetration of the coral-bleaching bacterium *Vibrio shiloi* into *Oculina patagonica*. *Applied and Environmental Microbiology* 66:3031-3036
- Barbieri E., Falzano L., Fiorentini C., Pianetti A., Baffone W., Fabbri A., Matarrese P., Casiere A., Katouli M., Kuhn I., Mollby R., Bruscolini F., Donelli G. (1999) Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast. *Applied and Environmental Microbiology* 65:2748-2753
- Bard S. M. (2000) Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 48:357-389
- Barja J. L., Lemos M. L., Toranzo A. E. (1989) Purification and characterization of an antibacterial substance produced by a marine *Alteromonas* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33:1674-1679
- Barreau-Roumiguière C., Montagnani C., Escoubas J. M. (2003) Characterization of a Tal/SCL-like transcription factor in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology* 27:793-800
- Bassler B., Yu C., Lee Y., Roseman S. (1991) Chitin utilization by marine bacteria. Degradation and catabolism of chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*. *Journal of Biological Chemistry* 266:24276-24286
- Bauer J. C., Young C. M. (2000) Epidermal lesions and mortality caused by vibriosis in deep-sea Bahamian echinoids: a laboratory study. *Diseases of Aquatic Organisms* 39:193-199
- Baumann P., Baumann L., Bang S., Wollkalis M. J. (1980) Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckea* and *Photobacterium*: abolition of the genus *Beneckea*. *Current Microbiology* 4:127-132
- Baumann P., Baumann L., Mandel M. (1971) Taxonomy of marine bacteria: the genus *Beneckea*. *Journal of Bacteriology* 107:268-294

- Baumann P., Schubert R. H. W. (1984) *Vibrionaceae* Véron 1965. In: Bergey's manual of systematic bacteriology Holt.-Baltimore J. G. (ed), Vol 1. Williams & Wilkins, London, p 516-538
- Beardsley C., Pernthaler J., Wosniok W., Amann R. (2003) Are readily culturable bacteria in coastal North Sea waters suppressed by selective grazing mortality? *Applied and Environmental Microbiology* 69:2624-2630
- Beattie J. H. (1985) Effects of growth and mortality differentials on production among selected stocks of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Journal of Shellfish Research* 5:49
- Beattie J. H., Chew K. K., Hershberger W. K. (1980) Differential survival of selected strains of pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during summer mortality. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* 70:184-189
- Becker C. D., Pauley G. B. (1968) An ovarian parasite (*Protista incertae sedis*) from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology* 12:425-437
- Bedier E., Cochard J. C., Le Moullac G., Patrois J. (1998) Selective breeding and pathology in penaeid shrimp culture: the genetic approach to pathogen resistance. *World Aquaculture* 29:46-51
- Ben-Haim Y., Thompson F. L., Thompson C. C., Cnockaert M. C., Hoste B., Swings J., Rosenberg E. (2003) *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:309-315
- Besnard-Cochennec N. (2001) *Bonamia ostreae*, parasite de l'huître plate, *Ostrea edulis* : sa position taxonomique parmi les parasites du groupe "microcell", analyses des interactions hôte/parasite chez plusieurs populations d'huîtres plates. Thèse de Doctorat, Université de La Rochelle, La Rochelle, 211 p
- Blake P. A., Merson M. H., Weaver R. E., Hollis D. G., Heublein P. C. (1979) Disease caused by a marine *Vibrio*. Clinical characteristics and epidemiology. *New England Journal of Medicine* 300:1-5
- Boettcher K. J., Ruby E. G. (1995) Detection and quantification of *Vibrio fischeri* autoinducer from symbiotic squid light organs. *Journal of Bacteriology* 177:1053-1058
- Bordas M. A., Balebona M. C., Zorrilla I., Borrego J. J., Morinigo M. A. (1996) Kinetics of adhesion of selected fish-pathogenic *Vibrio* strains of skin mucus of gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 62:3650-3654
- Borrego J. J., Castro D., Luque A., Paillard C., Maes P., Garcia M. T., Ventosa A. (1996a) *Vibrio tapetis* sp., nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46:480-484
- Borrego J. J., Luque A., Castro D., Santamaria J. A., Martinez-Manzanares E. (1996b) Virulence factors of *Vibrio* P1, the causative agent of brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Aquatic Living Resources* 9:125-136
- Boutet I., Tanguy A., Moraga D. (2004) Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329:147-157
- Boutet I., Tanguy A., Rousseau S., Auffret M., Moraga D. (2003) Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (*hsc70*) and heat shock protein 70 (*hsp70*) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cell Stress Chaperones* 8:76-85

- Bowden T. J., Menoyo-Luque D., Bricknell I. R., Wergeland H. (2002) Efficacy of different administration routes for vaccination against *Vibrio anguillarum* in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 12:283-285
- Bower S. M., McGladdery S. E. (2003) Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish. URL:
http://www-sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/title_e.htm
- Bower S. M., McGladdery S. E., Price I. M. (1994) Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Annual Review of Fish Diseases* 4:1-199
- Bower S. M., Meyer G. R. (1993) *Stegotricha enterikos* gen. nov., sp. nov. (class *Phyllopharyngea*, order *Rhychodida*), a parasitic ciliate in the digestive gland of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*), and its distribution in British Columbia. *Canadian Journal of Zoology* 71:2005-2017
- Bowser P. R., Rosemark R., Reiner C. R. (1981) A preliminary report of vibriosis in cultured American lobsters, *Homarus americanus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 37:80-85
- Brayton P. R., Bode R. B., Colwell R. R., MacDonell M. T., Hall H. L., Grimes D. J., West P. A., Bryant T. N. (1986) *Vibrio cincinnatiensis* sp. nov., a new human pathogen. *Journal of Clinical Microbiology* 23:104-108
- Brown C. (1981) A study of two shell-fish-pathogenic *Vibrio* strains isolated from a Long Island hatchery during a recent outbreak of disease. *Journal of Shellfish Research* 1:83-87
- Brown C., Losee E. (1978) Observation on natural and induced epizootics of vibriosis in *Crassostrea virginica* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 31:41-47
- Brown C., Tettelbach L. P. (1988) Characterization of a nonmotile *Vibrio* sp. pathogenic to larvae of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. *Aquaculture* 74:195-204
- Bruno D. W., Hastings T. S., Ellis A. E. (1986) Histopathology, bacteriology and experimental transmission of cold-water vibriosis in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms* 1:163-168
- Buddington R. K., Weiher E. (1999) The application of ecological principles and fermentable fibers to manage the gastrointestinal tract ecosystem. *Journal of Nutrition* 129:1446S-1450S
- Caceres-Martinez J., Macias-Montes De Oca P., Vasquez-Yeomans R. (1998) *Polydora* sp. infestation and health of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultured in Baja California, NW Mexico. *Journal of Shellfish Research* 17:259-264
- Cadavid D., O'Neill T., Schaefer H., Pachner A. R. (2000) Localization of *Borrelia burgdorferi* in the nervous system and other organs in a nonhuman primate model of lyme disease. *Laboratory Investigation* 80:1043-1054
- Castro D., Pujalte M. J., Lopez-Cortes L., Garay E., Borrego J. J. (2002) Vibrios isolated from the cultured manila clam (*Ruditapes philippinarum*): numerical taxonomy and antibacterial activities. *Journal of Applied Bacteriology* 93:438-447
- Chen S. C., Chen T. H., Wang P. C., Chen Y. C., Huang J. P., Lin Y. D., Chung H. C., Liaw L. L. (2003) *Metschnikowia bicuspidata* and *Enterococcus faecium* co-infection in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Diseases of Aquatic Organisms* 55:161-167

- Cheney D. P., Macdonald B. F., Elston R. A. (2000) Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *Journal of Shellfish Research* 19:353-359
- Cheng T. C. (1981) Bivalves. In: Invertebrate blood cells I Ratcliffe N. A., Rowley A. F. (eds). Academic Press, London, p 233-299
- Chew K. K., Sparks A. K., Katkansky S. C. (1965) Preliminary result on the seasonal size distribution of *Mytilicola orientalis* and the effect of this parasite on the condition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal Fisheries Research Board of Canada* 22:1099-1101
- Choi D. L., Lee N. S., Choi H. J., Park M. A., McGladdery S. E., Park M. S. (2004) Viral gametocytic hypertrophy caused by a papova-like virus infection in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Korea. *Diseases of Aquatic Organisms* 59:205-209
- Choquet G., Soudant P., Lambert C., Nicolas J. L., Paillard C. (2003) Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 57:109-116
- Chu F. L. E. (1988) Humoral defense factor in marine bivalves. *American Fisheries Society Special Publication* 18:178-188
- Cochennec N., Le Roux F., Berthe F., Gerard A. (2000) Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *Journal of Invertebrate Pathology* 76:26-32
- Comps M. (1972) Observations sur la résistance des huîtres du genre *Crassostrea* au cours de la mortalité massive de 1970-1971 dans le bassin de Marennes-Oléron. *Conseil International pour l'Exploration de la Mer CM 1972 / K22*
- Comps M. (1988) Epizootic diseases of oysters associated with viral infections. *American Fisheries Society Special Publication* 18:23-37
- Comps M., Duthoit J. L. (1976) Virus infection associated with 'gill disease' of the Portuguese Oyster *Crassostrea angulata* Lmk. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences. Paris* 283:1595-1596
- Comps M., Park M. S., Desportes I. (1986) Etude ultrastructurale de *Marteilioides Chungmuensis* n.g., n.sp., parasite des ovocytes de l'huître *Crassostrea gigas* TH. *Protistologica* XXII:279-285
- Crosa J. H. (1980) A plasmid associated with virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* specifies an iron-sequestering system. *Nature* 284:566-568
- Crosa J. H., Hodges L. L. (1981) Outer membrane proteins induced under conditions of iron limitation in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* 775. *Infection and Immunity* 31:223-227
- Culloty S. C., Mulcahy M. F. (1992) An evaluation of anaesthetics for *Ostrea edulis* (L.). *Aquaculture* 107:249-252
- Dalsgaard I., Hoi L., Siebeling R. J., Dalsgaard A. (1999) Indole-positive *Vibrio vulnificus* isolated from disease outbreaks on a Danish eel farm. *Diseases of Aquatic Organisms* 35:187-194
- Dastur D. K., Daver S. M. (1980) Striated muscle in four categories of leprosy. II. Fine structural changes. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 48:149-158

- Davey M. L., Hancock R. E., Mutharia L. M. (1998) Influence of culture conditions on expression of the 40-kilodalton porin protein of *Vibrio anguillarum* serotype O2. *Applied and Environmental Microbiology* 64:138-146
- Davis B. M., Kimsey H. H., Kane A. V., Waldor M. K. (2002) A satellite phage-encoded antirepressor induces repressor aggregation and cholera toxin gene transfer. *Embo Journal* 21:4240-4249
- Davis B. R., Fanning G. R., Madden J. M., Steigerwalt A. G., Bradford H. B., Jr., Smith H. L., Jr., Brenner D. J. (1981) Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. *Journal of Clinical Microbiology* 14:631-639
- Dégremont L. (2003) Etude des bases génétiques de la mortalité estivale et des relations avec la croissance chez les juvéniles de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de Doctorat, Université de Caen, Caen, 333 p
- Denkin S. M., Nelson D. R. (1999) Induction of protease activity in *Vibrio anguillarum* by gastrointestinal mucus. *Applied and Environmental Microbiology* 65:3555-3560
- DePaola A., Ulaszek J., Kaysner C. A., Tenge B. J., Nordstrom J. L., Wells J., Puhr N., Gendel S. M. (2003) Molecular, serological, and virulence characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environmental, food, and clinical sources in North America and Asia. *Applied and Environmental Microbiology* 69:3999-4005
- DePaola A., Motes M. L., Chan A. M., Suttle C. A. (1998) Phages infecting *Vibrio vulnificus* are abundant and diverse in oysters (*Crassostrea virginica*) collected in the Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* 64(1):346-351
- Di Lorenzo M., Stork M., Tolmasky M. E., Actis L. A., Farrell D., Welch T. J., Crosa L. M., Wertheimer A. M., Chen Q., Salinas P., Waldbeser L., Crosa J. H. (2003) Complete sequence of virulence plasmid pJM1 from the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* strain 775. *Journal of Bacteriology* 185:5822-5830
- Diggles B. K., Moss G. A., Carson J., Anderson C. D. (2000) Luminous vibriosis in rock lobster *Jasus verreauxi* (Decapoda: Palinuridae) phyllosoma larvae associated with infection by *Vibrio harveyi*. *Diseases of Aquatic Organisms* 43:127-137
- DiSalvo L. H., Blecka J., Zebal R. (1978) *Vibrio anguillarum* and larval mortality in a California coastal shellfish hatchery. *Applied and Environmental Microbiology* 35:219-221
- Dopazo C.P., Lemos M.L., Lodeiros C., Bolinches J., Barja J.L., Toranzo A.E. (1988) Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *Journal of Applied Bacteriology* 65:97-101
- Douillet P.A., Langdon C.J. (1994) Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 119:25-40
- Doyle M. P. (1990) Pathogenic *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *The Lancet* 336:1111-1115
- Duffes F., Leroi F., Boyaval P., Dousset X. (1999) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* 47:33-42

- Dungan C. F., 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., Schiewe M. H. (1989) Evidence for colonization and destruction of hinge ligaments in cultured juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) by *Cytophaga*-like bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 55:1128-1135
- Eaves L. E., Ketterer P. J. (1994) Mortalities in red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* associated with systemic *Vibrio mimicus* infection. *Diseases of Aquatic Organisms* 19:233-237
- Ebersole J. L., Kesavalu L., Schneider S. L., Machen R. L., Holt S. C. (1995) Comparative virulence of periodontopathogens in a mouse abscess model. *Oral Diseases* 1:115-128
- Egan S., Holmstrom C., Kjelleberg S. (2001) *Pseudoalteromonas ulvae* sp. nov., a bacterium with antifouling activities isolated from the surface of a marine alga. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:1499-1504
- Egidius E. (1987) Vibriosis: Pathogenicity and pathology. A review. *Aquaculture* 67:15-28
- Eldar A., Perl S., Frelier P. F., Bercovier H. (1999) Red drum *Sciaenops ocellatus* mortalities associated with *Streptococcus iniae* infection. *Diseases of Aquatic Organisms* 36:121-127
- Elston R. (1979) Economically important larval bivalve diseases and their control. *Rivista Italiana di Piscicoltura e Ittiopatologia* 14:47-54
- Elston R., Elliot E. L., Colwell R. R. (1982) Conchiolin infection and surface coating *Vibrio* : shell fragility, growth depression and mortalities in cultured oysters and clams, *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* and *Mercenaria mercenaria*. *Journal of Fish Diseases* 5:265-284
- Elston R., Leibovitz L. (1980) Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oysters, *Crassostrea virginica*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37:964-978
- Elston R., Leibovitz L., Relyea D., Zatlila J. (1981) Diagnosis of vibriosis in a commercial oyster hatchery epizootic: Diagnostic tools and management features. *Aquaculture* 24:53-62
- Elston R., Lockwood G. S. (1983) Pathogenesis of vibriosis in cultured juvenile red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. *Journal of Fish Diseases* 6:111-128
- Elston R. A., Beattie J. H., Friedman C., Hedrick R., Kent M. L. (1987) Pathology and significance of fatal inflammatory bacteraemia in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thuenberg. *Journal of Fish Diseases* 10:121-132
- Elston R. A., Cheney D., Frelier P., Lynn D. (1999a) Invasive orchitophryid ciliate infections in juvenile Pacific and Kumamoto oysters, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*. *Aquaculture* 174:1-14
- Elston R. A., Frelier P., Cheney D. P. (1999b) Extrapallial abscesses associated with chronic bacterial infections in the intensively cultured juvenile Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* 37:115-120
- Elston R. A., Wilkinson M. T. (1985) Pathology, management and diagnosis of oyster velar virus disease (OVVD). *Aquaculture* 48:189-210

- Esteve C., Amaro C., Biosca E. G., Garay E. (1995) Biochemical and toxigenic properties of *Vibrio furnissii* isolated from a European eel farm. *Aquaculture* 132:81-90
- Euzéby J. P. (2004) List of bacterial names with standing in nomenclature URL <http://www.bacterio.cict.fr/>
- Falkow S. (1988) Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Review of Infectious Diseases* 10 Suppl 2:S274-276
- FAO (2003) Yearbooks of fishery statistics summary tables - 2002 : World aquaculture production of fish, crustaceans, mollusks, etc... by principal species <http://www.fao.org/fi/statist/statist.asp>.
- Farley C. A. (1978) Viruses and viruslike lesions in marine mollusks. *Marine Fisheries Review* 40:18-20
- Farley C. A., Banfield W. G., Kasnic G., Foster W. S. (1972) Oyster herpes-type virus. *Science* 178:759-760
- Farley C. A., Wolf P. H., Elston R. A. (1988) A long-term study of "microcell" disease in oysters with a description of a new genus, *Mikrocytos* (g. n.), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp. n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp. n.). *Fishery Bulletin* 86:581-594
- Farmer III J. J., Hickman-Brenner F. W. (1991) The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. In: The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications Balows A., Trüper H. G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K. H. (eds), Vol III. Springer-Verlag, New York, p 2952-3011
- Farto R., Armada S. P., Montes M., Guisande J. A., Perez M. J., Nieto T. P. (2003) *Vibrio lentus* associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*). *Journal of Invertebrate Pathology* 83:149-156
- Farto R., Montes M., Perez M. J., Nieto T. P., Larsen J. L., Pedersen K. (1999) Characterization by numerical taxonomy and ribotyping of *Vibrio splendidus* biovar I and *Vibrio scophthalmi* strains associated with turbot cultures. *Journal of Applied Bacteriology* 86:796-804
- Farto R., Perez M. J., Fernandez-Briera A., Nieto T. P. (2002) Purification and partial characterisation of a fish lethal extracellular protease from *Vibrio pelagius*. *Veterinary Microbiology* 89:181-194
- Faury N., Saulnier D., Thompson F. L., Gay M., Swings J., Le Roux F. (2004) *Vibrio crassostreae* sp. nov., isolated from the hemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:2137-2140
- Feng S. Y. (1988) Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. *American Fisheries Society Special Publication* 18:153-168
- Fisher W. S. (1988) Environmental influence on host response: environmental influence on bivalve hemocyte function. *American Fisheries Society Special Publication* 18:225-237
- Ford S. E., Haskin H. H. (1982) History and Epizootiology of *Haplosporidium nelsoni* (MSX), an Oyster Pathogen in Delaware Bay, 1957 - 1980. *Journal of Invertebrate Pathology* 40:118-141
- Ford S. E., Kanaley S. A., Littlewood D. T. (1993) Cellular responses of oysters infected with *Haplosporidium nelsoni*: changes in circulating and tissue-infiltrating hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology* 61:49-57

- Foster J. S., McFall-Ngai M. J. (1998) Induction of apoptosis by cooperative bacteria in the morphogenesis of host epithelial tissues. *Development Genes and Evolution* 208:295-303
- Fouz B., Esteve-Gassent M. D., Barrera R., Larsen J. L., Nielsen M. E., Amaro C. (2001) Field testing of a vaccine against eel diseases caused by *Vibrio vulnificus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 45:183-189
- Friedman C. S., Beaman B. L., Chun J., Goodfellow M., Gee A., Hedrick R. P. (1998) *Nocardia crassostreae* sp. nov., the causal agent of nocardiosis in Pacific oysters. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48 Pt 1:237-246
- Friedman C. S., Biggs W., Shields J. D., Hedrick R. P. (2002) Transmission of withering syndrome in black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach. *Journal of Shellfish Research* 21:817-824
- Friedman C. S., Cloney D. F., Manzer D., Hedrick R. P. (1991) Haplosporidiosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology* 58:367-372
- Friedman C. S., Hedrick R. P. (1991) Pacific oyster nocardiosis: Isolation of the bacterium and induction of laboratory infections. *Journal of Invertebrate Pathology* 57:109-120
- Fuhrman J. A., McCallum K., Davis A. A. (1993) Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. *Applied and Environmental Microbiology* 59:1294-1302
- Gagnaire B. (2002) Environnement et immunomodulation : étude d'activités hématocytaires chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, Rapport de stage DES, Université Pierre et Marie Curie Paris VI 81 p
- Galstoff P. S. (1964) The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Service* 64:1-480
- Galtier N., Gouy M., Gautier C. (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Computer Applications in Biosciences* 12:543-548
- Garland C. D., Nash G. V., Sumner C. E., McMeekin T. A. (1983) Bacterial pathogens of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in a Tasmanian hatchery. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 34:483-487
- Gascuel O. (1997) BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Molecular Biology and Evolution* 14:685-695
- Gatesoupe F. J. (1997) Sidephore production and probiotic effect of *Vibrio* associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquatic Living Resources* 10:239-246
- Gatesoupe F. J. (1999) The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180:147-165
- Gauthier M. J., Flatau G. N. (1976) Antibacterial activity of marine violet-pigmented *Alteromonas* with special reference to the production of brominated compounds. *Canadian Journal of Microbiology* 22:1612-1619
- Gay M. (2001) Caractérisation de bactéries pathogènes isolées de naissains d'huître creuse *Crassostrea gigas* lors d'épisodes de mortalité estivale. Report No. N° 5 556707, CREMA, L'Houmeau, France 14 p

- Genthner F. J., Volety A. K., Oliver L. M., Fisher W. S. (1999) Factors influencing in vitro killing of bacteria by hemocytes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Applied and Environmental Microbiology* 65:3015-3020
- Glazebrook J. S., Campbell R. S. F., Thomas A. T. (1993) Studies on an ulcerative stomatitis-obstructive rhinitis-pneumonia disease complex in hatchling and juvenile sea turtles *Chelonia mydas* and *Caretta caretta*. *Diseases of Aquatic Organisms* 16:133-147
- Glude J. B. (1975) A summary report of pacific coast oyster mortality investigations 1965-1972 Third U.S.-Japan Meeting on Aquaculture, Tokyo, Japan, p 1-28
- Goarant C. (2000) Epidémiologie et facteurs de virulence des bactéries du genre *Vibrio* responsables de mortalité de crevettes d'élevage en Nouvelle- Calédonie. Perspectives de lutte. Thèse de Doctorat, Centre universitaire de Polynésie Française, Tahiti, Polynésie Française, 174 p
- Goarant C., Herlin J., Brizard R., Marteau A. L., Martin C., Martin B. (2000) Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 40:101-107
- Goarant C., Regnier F., Brizard R., Marteau A.-L. (1998) Acquisition of susceptibility to *Vibrio penaeicida* in *Penaeus stylirostris* postlarvae and juveniles. *Aquaculture* 169:291-296
- Goedken M., De Guise S. (2004) Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish and Shellfish Immunology* 16:539-552
- Gouletquer P., Soletchnik P., Le Moine O., Razet D., Geairon P., Faury N., Taillade S. (1998) Summer mortality of the Pacific cupped oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oléron (France). *Conseil International pour l'Exploration de la Mer CM 1998 / CC 14 : 20 p*
- Gram L., Melchiorson J., Spanggaard B., Huber I., Nielsen T. F. (1999) Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied and Environmental Microbiology* 65:969-973
- Grimes D. J., Stemmler J., Hada H., May E. B., Maneval D., Hetrick F. M., Jones R. T., Stoskopf M., Colwell R. R. (1984) *Vibrio* species associated with mortality of sharks held in captivity. *Microbial Ecology* 10:271-282
- Grimont P. A. (1984) Use of DNA reassociation in bacterial classification. *Canadian Journal of Microbiology* 34:541-546
- Grischkowsky R. S., Liston J. (1974) Bacterial pathogenicity in laboratory-induced mortality of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg). *Proceedings of the National Shellfisheries Association* 64:82-91
- Grisez L., Chair M., Sorgeloos P., Ollevier F. (1996) Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge through live feed. *Diseases of Aquatic Organisms* 26:181-187
- Grisez L., Reyniers J., Verdonck L., Swings J., Ollevier F. (1997) Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae, from two hatcheries, during larval development. *Aquaculture* 155:387-399
- Grizel H. (1997) Les maladies des mollusques bivalves: risques et prévention. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties* 16:161-171

- Grizel H. (2003) Atlas d'histologie et de cytologie des mollusques bivalves marins, Editions IFREMER, Plouzané
- Grizel H., Comps M., Bonami J. R., Cousserans F., Duthoit J. L., Le Pennec M. A. (1974) Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné. *Science et Pêche, Bulletin de l'Institut des Pêches Maritimes* 240:7-30
- Grizel H., Heral M. (1991) Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *Conseil International pour l'Exploration de la Mer* 47:399-403
- Gueguen Y., Cadoret J. P., Flament D., Barreau-Roumiguere C., Girardot A. L., Garnier J., Hoareau A., Bachere E., Escoubas J. M. (2003) Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 303:139-145
- Guillard R. R. L. (1959) Further evidence of the destruction of bivalve larvae by bacteria. *Biological Bulletin* 117:258-266
- Gupta R. S. (1998) Protein phylogenies and signature sequences: A reappraisal of evolutionary relationships among archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:1435-1491
- Hada H. S., West P. A., Lee J. V., Stemmler J., Colwell R. R. (1984) *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve mollusks. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34:1-4
- Handley S. J., Bergquist P. R. (1997) Spionid polychaete infestations of intertidal pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg), Mahurangi Harbour, northern New Zealand. *Aquaculture* 153:191-205
- Hara-Kudo Y., Sugiyama K., Nishibuchi M., Chowdhury A., Yatsuyanagi J., Ohtomo Y., Saito A., Nagano H., Nishina T., Nakagawa H., Konuma H., Miyahara M., Kumagai S. (2003) Prevalence of pandemic thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in seafood and the coastal environment in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 69:3883-3891
- Hatzizisis D., Gaitanaki C., Beis I. (2000) Degradation of myofibrillar proteins by a calpain-like proteinase in the arm muscle of *Octopus vulgaris*. *Journal of Comparative Physiology. Part B. Biochemical, Systematic, and Environmental Physiology* 170:447-456
- Heidelberg J. F., Heidelberg K. B., Colwell R. R. (2002a) Bacteria of the gamma-subclass Proteobacteria associated with zooplankton in Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology* 68:5498-5507
- Heidelberg J. F., Heidelberg K. B., Colwell R. R. (2002b) Seasonality of Chesapeake Bay bacterioplankton species. *Applied and Environmental Microbiology* 68:5488-5497
- Hentschel U., Schmid M., Wagner M., Fieseler L., Gernert C., Hacker J. (2001) Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiology Ecology* 35:305-312
- Hickman F. W., Farmer J. J., 3rd, Hollis D. G., Fanning G. R., Steigerwalt A. G., Weaver R. E., Brenner D. J. (1982) Identification of *Vibrio hollisae* sp. nov. from patients with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* 15:395-401

- Hickman-Brenner F. W., Brenner D. J., Steigerwalt A. G., Schreiber M., Holmberg S. D., Baldy L. M., Lewis C. S., Pickens N. M., Farmer J. J., 3rd (1984) *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii* isolated from a stool sample of one patient. *Journal of Clinical Microbiology* 20:125-127
- Hine P. M. (1999) The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology* 9:367-385
- Hine P. M., Bower S. M., Meyer G. R., Cochenne-Laureau N., Berthe F. C. (2001) Ultrastructure of *Mikrocytos mackini*, the cause of Denman Island disease in oysters *Crassostrea* spp. and *Ostrea* spp. in British Columbia, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms* 45:215-227
- Hine P. M., Wesney B., Hay B. E. (1992) Herpesviruses associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* 12:135-142
- Holmstrom C., Kjelleberg S. (1999) Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiology Ecology* 30:285-293
- Holmstrom K., Gram L. (2003) Elucidation of the *Vibrio anguillarum* genetic response to the potential fish probiont *Pseudomonas fluorescens* AH2, using RNA-arbitrarily primed PCR. *Journal of Bacteriology* 185:831-842
- Honda T., Ni Y., Miwatani T. (1989) Purification of a TDH-related hemolysin produced by a Kanagawa phenomenon-negative clinical isolate of *Vibrio parahaemolyticus* 06: K46. *FEMS Microbiology Letters* 48:241-245
- Honda T., Ni Y., Miwatani T., Adachi T., Kim J. (1992) The thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* is a pore-forming toxin. *Canadian Journal of Microbiology* 38:1175-1180
- Howard D. W., Smith C. S. (1983) Histological techniques for marine bivalve mollusks, NOAA Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25, Woods Hole, Massachusetts, USA
- Howland K. H., Cheng T. C. (1982) Identification of bacterial chemoattractants for oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology* 39:123-132
- Huang C. Y., Liu P. C., Lee K. K. (2001) Withering syndrome of the small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, is caused by *Vibrio parahaemolyticus* and associated with thermal induction. *Zeitschrift für Naturforschung C - A Journal of Biosciences* 56c:898-901
- Hubert F., Van Der Knaap W., Noel T., Roch P. (1996) Cytotoxic and antibacterial properties of *Mytilus galloprovincialis*, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (bivalve molluscs) hemolymph. *Aquatic Living Resources* 9:115-124
- Hund E. (2001) Neurological complications of sepsis: critical illness polyneuropathy and myopathy. *Journal of Neurobiology* 248:929-934
- Imai T., Numachi K.-i., Oizumi J., Sato S. (1965) Studies on the mass mortality of the oyster in Matsushima Bay II. Search for the cause of mass mortality and the possibility to prevent it by transplantation experiment. *Bulletin of the Tohoku National Fisheries Research Institute* 25:27-38
- Irianto A., Austin B. (2002a) Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases* 25:633-642
- Irianto A., Austin B. (2002b) Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 25:333-350

- Ishimaru K., Akagawa-Matsushita M., Muroga K. (1996) *Vibrio ichthyoenteri* sp. nov., a pathogen of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46:155-159
- Isnansetyo A., Kamei Y. (2003) MC21-A, a bactericidal antibiotic produced by a new marine bacterium, *Pseudoalteromonas phenolica* sp. nov. O-BC30(T), against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47:480-488
- James S. G., Holmstrom C., Kjelleberg S. (1996) Purification and characterization of a novel antibacterial protein from the marine bacterium D2. *Applied and Environmental Microbiology* 62:2783-2788
- Janda J. M., Powers C., Bryant R. G., Abbott S. L. (1988) Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. *Clinical Microbiology Reviews* 1:245-267
- Janssen P., Coopman R., Huys G., Swings J., Bleeker M., Vos P., Zabeau M., Kersters K. (1996) Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* 142 (Pt 7):1881-1893
- Jeffries V. E. (1982) Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 29:201-226
- Jeong K. C., Jeong H. S., Rhee J. H., Lee S. E., Chung S. S., Starks A. M., Escudero G. M., Gulig P. A., Choi S. H. (2000) Construction and phenotypic evaluation of a *Vibrio vulnificus* *vvpE* mutant for elastolytic protease. *Infection and Immunity* 68:5096-5106
- Jian J., Wu Z. (2003) Effects of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity and disease resistance of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson). *Aquaculture* 218:1-9
- Joborn A., Olsson J. C., Westerdahl A., Conway P. L., Kjelleberg S. (1997) Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1. *Journal of Fish Diseases* 20:383-392
- Jorquera M. A., Valencia G., Eguchi M., Katayose M., Riquelme C. (2002) Disinfection of seawater for hatchery aquaculture systems using electrolytic water treatment. *Aquaculture* 207:213-224
- Kaneko T., Colwell R. R. (1978) The annual cycle of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Microbial Ecology* 4:135-155
- Karaolis D. K., Johnson J. A., Bailey C. C., Boedeker E. C., Kaper J. B., Reeves P. R. (1998) A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:3134-3139
- Katkansky S. C., Warner R. W. (1970) Sporulation of a haplosporidan in a pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Humboldt Bay, California. *Journal Fisheries Research Board of Canada* 27:1320-1321
- Kimura M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120
- Kita-Tsukamoto K., Oyaizu H., Nanba K., Simidu U. (1993) Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family *Vibrionaceae*, determined on the basis of 16S rRNA sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43:8-19

- Koch R. (1884) Sechster Bericht des Leiters der deutschen wissenschaftlichen Commission zur Erforschung der Cholera, Geheimen Regeierungsraths Dr Koch, Kalkutta, den 2. Februar 1884. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 10:191
- Kodama H., Moustafa M., Ishiguro S., Mikami T., Izawa H. (1984) Extracellular virulence factors of fish *Vibrio*: relationships between toxic material, hemolysin, and proteolytic enzyme. *American Journal of Veterinary Research* 45:2203-2207
- Kodama H., Moustafa M., Mikami T., Izawa H. (1985) Characterization of extracellular substance of *Vibrio anguillarum* toxic for rainbow trout and mice. *Microbiology and Immunology* 29:909-920
- Kueh C. S., Chan K. Y. (1985) Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. *Journal of Applied Bacteriology* 59:41-47
- Lacoste A., Jalabert F., Malham S., Cueff A., Gelebart F., Cordevant C., Lange M., Poulet S. A. (2001a) A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Diseases of Aquatic Organisms* 46:139-145
- Lacoste A., Jalabert F., Malham S. K., Cueff A., Poulet S. A. (2001b) Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2304-2309
- Lacoste A., Malham S. K., Cueff A., Poulet S. A. (2001c) Noradrenaline modulates oyster hemocyte phagocytosis via a beta-adrenergic receptor-cAMP signaling pathway. *General and Comparative Endocrinology* 122:252-259
- Lacoste A., Malham S. K., Cueff A., Poulet S. A. (2001d) Stress-induced catecholamine changes in the hemolymph of the oyster *Crassostrea gigas*. *General and Comparative Endocrinology* 122:181-188
- Lacoste A., Malham S. K., Gelebart F., Cueff A., Poulet S. A. (2002) Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology* 26:1-9
- Lamas J., Anadon R., Devesa S., Toranzo A. E. (1990) Visceral neoplasia and epidermal papillomas in cultured turbot *Scophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 8:179-187
- Lambert C., Nicolas J. L. (1998) Specific inhibition of chemiluminescent activity by pathogenic *Vibrios* in hemocytes of two marine bivalves: *Pecten maximus* and *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology* 71:53-63
- Lambert C., Nicolas J. L., Cilia V., Corre S. (1998) *Vibrio pectenecida* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48 Pt 2:481-487
- Lambert C., Nicolas J. L., Cilla V. (1999) *Vibrio splendidus*-related strain isolated from brown deposit in scallop (*Pecten maximus*) cultured in Brittany (France). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 19:102-106
- Lambert C., Soudant P., Choquet G., Paillard C. (2003) Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish and Shellfish Immunology* 15:225-240

- Lane E., Birkbeck T. H. (2000) Species specificity of some bacterial pathogens of bivalve molluscs is correlated with their interaction with bivalve haemocytes. *Journal of Fish Diseases* 23:275-279
- Lapègue S., Bédier E., Goyard E., Dégremont L., Baud J. P., Gérard A., Gouilletquer P., Boudry P. (2003) Apport d'un programme de génétique à une filière de production aquacole : l'exemple de l'ostréiculture Actes de Colloque Styli 2003, IFREMER, Noumea, Nouvelle-Calédonie, 23 mai-9 juin
- Largo D. B., Fukami K., Nishijima T. (1999) Time-dependent attachment mechanism of bacterial pathogen during ice-ice infection in *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*:129-136
- Le Deuff R. M. (1995) Contribution à l'étude de virus de mollusques marins apparentés aux Iridoviridae et aux Herpesviridae. Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux 2, Bordeaux, 234 p
- Le Roux F., Audemard C., Barnaud A., Berthe F. (1999) DNA Probes As Potential Tools for the Detection of *Marteilia refringens*. *Marine Biotechnology* 1:588-597
- Le Roux F., Gay M., Lambert C., Nicolas J. L., Gouy M., Berthe F. (2004) Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences. *Diseases of Aquatic Organisms* 58:143-150
- Le Roux F., Gay M., Lambert C., Waechter M., Poubalanne S., Chollet B., Nicolas J. L., Berthe F. (2002) Comparative analysis of *Vibrio splendidus* related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic Living Resources* 15:251-258
- Lee K. K., Chen F. R., Yu S. R., Yang T. I., Liu P. C. (1997) Effects of extracellular products of *Vibrio alginolyticus* on penaeid prawn plasma components. *Letters in Applied Microbiology* 25:98-100
- Lee K.-K., Liu P.-C., Chen Y.-C., Huang C.-Y. (2001) The implication of ambient temperature with the outbreak of vibriosis in cultured small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* Lischke. *Journal of Thermal Biology* 26:585-587
- Lee K. K., Yang T. I., Liu P. C., Wu J. L., Hsu Y. L. (1999) Dual challenges of infectious pancreatic necrosis virus and *Vibrio carchariae* in the grouper, *Epinephelus* sp. *Virus Research* 63:131-134
- Lee S. O., Kato J., Takiguchi N., Kuroda A., Ikeda T., Mitsutani A., Ohtake H. (2000) Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4334-4339
- Li T., Ding M., Zhang J., Xiang J., Liu R. (1998) Studies on the pustule disease of abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) on the Dalian coast. *Journal of Shellfish Research* 17:707-711
- Liltved H., Hektoen H., Efraimsen H. (1995) Inactivation of bacterial and viral fish pathogens by ozonation or UV irradiation in water of different salinity. *Aquacultural Engineering* 14:107-122
- Ling S. H., Wang X. H., Xie L., Lim T. M., Leung K. Y. (2000) Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* in *in vivo* and *in vitro* fish models. *Microbiology* 146 (Pt 1):7-19

- Lipovsky V. P., Chew K. K. (1972) Mortality of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*): the influence of temperature and enriched seawater on oyster survival. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* 62:72-72
- Liu P., Chen Y., Huang C., Lee K. (2000) Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cultured small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, with withering syndrome. *Letters in Applied Microbiology* 31:433-437
- Liu P. C., Chen Y. C., Lee K. K. (2001) Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Microbios* 104:71-77
- Liu Y., Fletcher H. M. (2001) Environmental regulation of *recA* gene expression in *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiology and Immunology* 16:136-143
- Lodeiros C., Bolinches J., Dopazo C. P., Toranzo A. E. (1987) Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture* 65:15-29
- Lopez-Cortes L., Castro D., Navas J. I., Borrego J. J. (1999) Phagocytic and chemotactic responses of manila and carpet shell clam haemocytes against *Vibrio tapetis*, the causative agent of brown ring disease. *Fish and Shellfish Immunology* 9:543-555
- Lovelace T. E., Tubiash H. S., Colwell R. R. (1968) Quantitative and qualitative commensal bacterial flora of *Crassostrea virginica* in Chesapeake Bay. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* 58:82-87
- Luña-Gonzalez A., Maeda-Martinez A. N., Sainz J. C., Ascencio-Valle F. (2002) Comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve mollusks to a *Vibrio alginolyticus* strain. *Diseases of Aquatic Organisms* 49:221-226
- Luña-Gonzalez A., Maeda-Martinez A. N., Vargas-Albores F., Ascencio-Valle F., Robles-Mungaray M. (2003) Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish and Shellfish Immunology* 15:275-282
- MacDonald J. B., Socransky S. S., Gibbons R. J. (1963) Aspects of the pathogenesis of mixed anaerobic infections of mucous membranes. *Journal of Dental Research* 42:529-544
- MacDonell, M. T., and Colwell R. R.. (1985). Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Systematic and Applied Microbiology* 6:171-182.
- MacDonell M. T., Singleton F. L., Hood M. A. (1982) Diluent composition for use of API 20E in characterizing marine and estuarine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 44:423-427
- Magalhaes V., Branco A., de Andrade Lima R., Magalhaes M. (1996) *Vibrio metschnikovii* among diarrheal patients during cholera epidemic in Recife Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 38:1-3
- Martin Y., Bonnefont J. L., Chancerelle L. (2002) Gorgonians mass mortality during the 1999 late summer in French Mediterranean coastal waters: the bacterial hypothesis. *Water Research* 36:779-782
- Matsusato T., Masumura K. (1981) Abnormal enlargement of the ovary of oyster, *Crassostrea gigas* (thunberg) by an unidentified parasite. *Fish Pathology* 15:207-212

- Maugeri T. L., Caccamo D., Gugliandolo C. (2000) Potentially pathogenic vibrios in brackish waters and mussels. *Journal of Applied Bacteriology* 89:261-266
- Maurer D., Comps M. (1986) Mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* dans le Bassin d'Arcachon : facteurs du milieu, aspects biochimiques et histologiques. *Colloque International de Pathologie en Aquaculture Marine, Montpellier*:29-42
- McCarthy S. A., Johnson R. M., Kakimoto D. (1994) Characterization of an antibiotic produced by *Alteromonas luteoviolacea* Gauthier 1982, 85 isolated from Kinko Bay, Japan. *Journal of Applied Bacteriology* 77:426-432
- McFall-Ngai M. J. (2000) Negotiations between animals and bacteria: the 'diplomacy' of the squid-vibrio symbiosis. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A. Molecular and Integrative Physiology* 126:471-480
- McFall-Ngai M. J., Ruby E. G. (2000) Developmental biology in marine invertebrate symbioses. *Current Opinion in Microbiology* 3:603-607
- McLauchlan P. E., Collet B., Ingerslev E., Secombes C. J., Lorenzen N., Ellis A. E. (2003) DNA vaccination against viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in rainbow trout: size, dose, route of injection and duration of protection--early protection correlates with Mx expression. *Fish and Shellfish Immunology* 15:39-50
- Meighen E. A. (1993) Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the *lux* genes. *Faseb Journal* 7:1016-1022
- Mellado E., Moore E. R., Nieto J. J., Ventosa A. (1996) Analysis of 16S rRNA gene sequences of *Vibrio costicola* strains: description of *Salinivibrio costicola* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46:817-821
- Mergehagen S. E., Thonard J. C., Scherp H. W. (1958) Studies on synergistic infections. I. Experimental infections with anaerobic streptococci. *Journal of Infectious Diseases* 103:33-44
- Metchnikoff E. (1907) *The Prolongation of Life: optimistic studies*, Chalmers M., 344 p
- Meyers T. R., Short S., Eaton W. (1990) Summer mortalities and incidental parasitisms of cultured Pacific oysters in Alaska. *Journal of Aquatic Animal Health* 2:172-176
- Mialhe E., Bachere E., Boulo V., Cadoret J. P., Rousseau C., Cedeno V., Saraiva E., Carrera L., Colwell R. R., et al. (1995) Future of biotechnology-based control of disease in marine invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 4:275-283
- Milagres A. M., Machuca A., Napoleao D. (1999) Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods* 37:1-6
- Milton D. L., Norqvist A., Wolf-Watz H. (1992) Cloning of a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology* 174:7235-7244
- Milton D. L., O'Toole R., Horstedt P., Wolf-Watz H. (1996) Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology* 178:1310-1319
- Miossec L. (2002) Les vibrions pathogènes pour l'homme : le rique associé au milieu marin en France, IFREMER DEL Département Microbiologie et Phycotoxines, Nantes 48 p

- Miranda C. D., Zemelman R. (2002) Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. *The Science of The Total Environment* 293:207-218
- Mitta G., Vandenbulcke F., Hubert F., Roch P. (1999) Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *Journal of Cell Science* 112:4233-4242
- Miyamoto Y., Kato T., Obara Y., Akiyama S., Takizawa K., Yamai S. (1969) In vitro hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity. *Journal of Bacteriology* 100:1147-1149
- Miyazaki T., Goto K., Kobayashi T., Kageyama T., Miyata M. (1999) Mass mortalities associated with a virus disease in Japanese pearl oysters *Pinctada fucata martensii*. *Diseases of Aquatic Organisms* 37:1-12
- Miyazaki T., Nozawa N., Kobayashi T. (2000) Clinical trial results on the use of a recombinant feline interferon-omega to protect Japanese pearl oysters *Pinctada fucata martensii* from akoya-virus infection. *Diseases of Aquatic Organisms* 43:15-26
- Montagnani C., Le Roux F., Berthe F., Escoubas J. M. (2001) Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms(1). *FEBS Letters* 500:64-70
- Montes M., Perez M. J., Nieto T. P. (1999) Numerical taxonomy of gram-negative, facultative anaerobic bacteria isolated from skin of turbot (*Scophthalmus maximus*) and surrounding water. *Systematic and Applied Microbiology* 22:604-618
- Moore J. D., Cherr G. N., Friedman C. S. (2001) Detection of *Candidatus Xenohalictis californiensis* (Rickettsiales-like prokaryote) inclusions in tissue squashes of abalone (*Haliotis* spp.) gastrointestinal epithelium using a nucleic acid fluorochrome. *Diseases of Aquatic Organisms* 46:147-152
- Mori K., Imai T., Toyoshima K., Usui I. (1965) Studies on the Mass Mortality of the Oyster in Matsushima Bay IV. Changes in the Physiological Activity and the Glycogen Content of the Oyster During the Stages of Sexual Maturation and Spawning. *Bulletin of the Tohoku National Fisheries Research Institute* 25:49-64
- Moriarty D. J. W. (1998) Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164:351-358
- Morinigo M. A., Romalde J. L., Chabrillon M., Magarinos B., Arijo S., Balebona M. C., Toranzo A. E. (2002) Effectiveness of a divalent vaccine for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) against *Vibrio alginolyticus* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 22:298-303
- Morris J. G., Jr., Miller H. G., Wilson R., Tacket C. O., Hollis D. G., Hickman F. W., Weaver R. E., Blake P. A. (1982) Illness caused by *Vibrio damsela* and *Vibrio hollisae*. *The Lancet* 1:1294-1297
- Mougel C., Thioulouse J., Perriere G., Nesme X. (2002) A mathematical method for determining genome divergence and species delineation using AFLP. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:573-586
- Munn C. B. (1978) Haemolysin production by *Vibrio anguillarum*. *FEMS Microbiology Letters* 3:265-268

- Munro J., Oakey J., Bromage E., Owens L. (2003) Experimental bacteriophage-mediated virulence in strains of *Vibrio harveyi*. *Diseases of Aquatic Organisms* 54:187-194
- Muroga K. (2001) Viral and bacterial diseases of marine fish and shellfish in Japanese hatcheries. *Aquaculture* 202:23-44
- Muroga K., Jo Y., Nishibuchi M. (1976) *Vibrio anguillarum* isolated from the European eel (*Anguilla anguilla*) cultured in Japan. *Journal of the Faculty of Fisheries and Animal Husbandry, Hiroshima University* 15:29-34
- Muroga K., Suzuki K., Ishimaru K., Mogami K. (1994) Vibriosis of swimming crab *Portunus trituberculatus* in larviculture. *Journal of the World Aquaculture Society* 25:50-54
- Myrand B., Guderley H., Himmelman J. H. (2000) Reproduction and summer mortality of blue mussels *Mytilus edulis* in the Magdalen Islands, southern Gulf of St. Lawrence. *Marine Ecology Progress Series* 197:193-207
- Naciri-Graven Y., Martin A.-G., Baud J.-P., Renault T., Gerard A. (1998) Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 224:91-107
- Ngo T. T., Berthe F. C., Choi K. S. (2003) Prevalence and infection intensity of the ovarian parasite *Marteilioides chungmuensis* during an annual reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* 56:259-267
- Nicolas J. L., Ansquer D., Cochard J. C. (1992a) Isolation and characterization of a pathogenic bacterium specific to *Manila clam Tapes philippinarum* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 14:153-159
- Nicolas J. L., Basuyaux O., Mazurie J., Thebault A. (2002) *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Diseases of Aquatic Organisms* 50:35-43
- Nicolas J. L., Comps M., Cochennec N. (1992b) Herpes-like virus infecting pacific-oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 12:11-13
- Nicolas J. L., Corre S., Gauthier G., Robert R., Ansquer D. (1996) Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Diseases of Aquatic Organisms* 27:67-76
- Nishimori E., Hasegawa O., Numata T., Wakabayashi H. (1998) *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor supratexta*. *Fish Pathology* 33:495-502
- Norqvist A., Hagstrom A., Wolf-Watz H. (1989) Protection of rainbow trout against vibriosis and furunculosis by the use of attenuated strains of *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 55:1400-1405
- Norqvist A., Norrman B., Wolf-Watz H. (1990) Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity* 58:3731-3736
- Norqvist A., Wolf-Watz H. (1993) Characterization of a novel chromosomal virulence locus involved in expression of a major surface flagellar sheath antigen of the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity* 61:2434-2444

- Nottage A. S., Birkbeck T. H. (1987) Purification of a proteinase produced by the bivalve pathogen *Vibrio alginolyticus* NCMB 1339. *Journal of Fish Diseases* 10:211-220
- Nyholm S. V., Stabb E. V., Ruby E. G., McFall-Ngai M. J. (2000) Establishment of an animal-bacterial association: recruiting symbiotic vibrios from the environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:10231-10235
- Nystrom T., Flardh K., Kjelleberg S. (1990) Responses to multiple-nutrient starvation in marine *Vibrio* sp. strain CCUG 15956. *Journal of Bacteriology* 172:7085-7097
- Olafsen J. A., Fletcher T. C., Grant P. T. (1992) Agglutinin activity in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following in vivo *Vibrio anguillarum* challenge. *Developmental and Comparative Immunology* 16:123-138
- Olicard C. (2003) Recherche de substances antivirales chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de Doctorat, Université de La Rochelle, La Rochelle, 140 p
- Oliver L. M., Fisher W. S., Volety A. K., Malaeb Z. (2003) Greater hemocyte bactericidal activity in oysters (*Crassostrea virginica*) from a relatively contaminated site in Pensacola Bay, Florida. *Aquatic Toxicology* 64:363-373
- Onderdonk A. B., Bartlett J. G., Louie T., Sullivan-Seigler N., Gorbach S. L. (1976) Microbial synergy in experimental intra-abdominal abscess. *Infection and Immunity* 13:22-26
- Ortigosa M., Esteve C., Pujalte M. J. (1989) *Vibrio* species in seawater and mussels: abundance and numerical taxonomy. *Systematic and Applied Microbiology* 12:316-325
- Ortigosa M., Garay E., Pujalte M. J. (1994) Numerical taxonomy of *Vibrionaceae* isolated from oysters and seawater along an annual cycle. *Systematic and Applied Microbiology* 17:216-225
- Oubella R., Maes P., Paillard C., Auffret M. (1993) Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Diseases of Aquatic Organisms* 15:193-197
- Oubella R., Paillard C., Maes P., Auffret M. (1994) Changes in hemolymph parameters in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia) following bacterial challenge. *Journal of Invertebrate Pathology* 64:33-38
- Pacini F. (1854) Osservazione microscopiche e deduzioni patologiche sul *Cholera Asiatico*. *Gazzetta Medica Italiana Toscana Firenze* 6:405-412
- Paillard C., Maes P. (1995a) The brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: I. Ultrastructural alterations of the Periostracal Lamina. *Journal of Invertebrate Pathology* 65:91-100
- Paillard C., Maes P. (1995b) The brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: II. Microscopic study of the brown ring syndrome. *Journal of Invertebrate Pathology* 65:101-110
- Paillard C., Maes P., Oubella R. (1994) Brown ring disease in clams. *Annual Review of Fish Diseases* 4:219-240
- Pavia A. T., Bryan J. A., Maher K. L., Hester T. R., Jr., Farmer J. J., 3rd (1989) *Vibrio carchariae* infection after a shark bite. *Annals of Internal Medicine* 111:85-86
- Pennisi E. (1996) Evolutionary and systematic biologists converge. *Science* 273:181-182

- Pichot Y., Comps M., Tige G., Grizel H., Rabouin M. A. (1980) Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 43:131-140
- Plana S., Le Pennec M. (1991) Alterations in the digestive diverticula and nutritional consequences in the clam *Ruditapes philippinarum* infected by a *Vibrio*. *Aquatic Living Resources* 4:255-264
- Portrait V., Gendron-Gaillard S., Cottenneau G., Pons A. M. (1999) Inhibition of pathogenic *Salmonella enteritidis* growth mediated by *Escherichia coli* microcin J25 producing strains. *Canadian Journal of Microbiology* 45:988-994
- Poulet S. A., Lennon J.-F., Plouvenez F., Jalabert F., Correc G., Cueff A., Lacoste A. (2003) A nondestructive tool for the measurement of muscle strength in juvenile oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 217:49-60
- Powell J. L., Wright A. C., Wasserman S. S., Hone D. M., Morris J. G., Jr. (1997) Release of tumor necrosis factor alpha in response to *Vibrio vulnificus* capsular polysaccharide in *in vivo* and *in vitro* models. *Infection and Immunity* 65:3713-3718
- Prieur D. (1981) Les relations entre mollusques bivalves et bactéries hétérotrophes en milieu marin: étude analytique et expérimentale. Thèse de Doctorat, Université de Brest, Brest, 266 p
- Pujalte M. J., Ortigosa M., Macian M. C., Garay E. (1999) Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater. *International Microbiology* 2:259-266
- Raimondi F., Kao J. P., Fiorentini C., Fabbri A., Donelli G., Gasparini N., Rubino A., Fasano A. (2000) Enterotoxigenicity and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in *in vitro* systems. *Infection and Immunity* 68:3180-3185
- Renault T., Cochenne N. (1994) Rickettsia-like organisms in the cytoplasm of gill epithelial cells of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology* 64:160-162
- Renault T., Cochenne N. (1995) Chlamydia-like organisms in ctenidia mantle cells off the Japanese oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. *Diseases of Aquatic Organisms* 23:153-159
- Renault T., Cochenne N., Le Deuff R. M., Chollet B. (1994a) Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 14:64-66
- Renault T., Le Deuff R. M., Chollet B., Cochenne N., Gerard A. (2000a) Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 42:173-183
- Renault T., Le Deuff R. M., Cochenne N., Chollet B., Maffart P. (1995) Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: a comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Veterinary Research* 26:539-543
- Renault T., Le Deuff R. M., Cochenne N., Maffart P. (1994b) Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France-comparative study. *Revue Médicale Vétérinaire* 145:735-742

- Renault T., Le Deuff R.-M., Lipart C., Delsert C. (2000b) Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *Journal of Virological Methods* 88:41-50
- Renault T., Stokes N. A., Chollet B., Cochenne N., Berthe F., Gerard A., Burreson E. M. (2000c) Haplosporidiosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. *Diseases of Aquatic Organisms* 42:207-214
- Rengpipat S., Rukpratanporn S., Piyatiratitivorakul S., Menasaveta P. (2000) Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture* 191:271-288
- Rico-Mora R., Voltolina D., Villaescusa-Celaya J. A. (1998) Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) cultures. *Aquacultural Engineering* 19:1-6
- Ringo E., Vadstein O. (1998) Colonization of *Vibrio pelagius* and *Aeromonas caviae* in early developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Journal of Applied Microbiology* 84:227-233
- Riquelme C., Hayashida G., Toranzo A. E., Vilches J., Chavez P. (1995) Pathogenicity studies on a *Vibrio anguillarum*-related (VAR) strain causing an epizootic in *Argopecten purpuratus* larvae cultured in Chile. *Diseases of Aquatic Organisms* 22:135-141
- Riquelme C., Toranzo A. E., Barja J. L., Vergara N., Araya R. (1996) Association of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio alginolyticus* with larval mortalities of scallop (*Argopecten purpuratus*). *Journal of Invertebrate Pathology* 67:213-218
- Riquelme C. E., Jorquera M. A., Rojas A. I., Avendano R. E., Reyes N. (2001) Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* larvae (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 192:111-119
- Robert R., Gerard A. (1999) Bivalve hatchery technology: the current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquatic Living Resources* 12:121-130
- Roch P. (1999) Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172:125-145
- Roch P., Hubert F., Van der Knaap W., Noel T. (1996) Present knowledge on the molecular basis of cytotoxicity, antibacterial activity and stress response in marine bivalves. *Italian Journal of Zoology* 63:311-316
- Romestand B., Corbier F., Roch P. (2002) Protease inhibitors and haemagglutinins associated with resistance to the protozoan parasite, *Perkinsus marinus*, in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Parasitology* 125:323-329
- Rosenberg E., Ben-Haim Y. (2002) Microbial diseases of corals and global warming. *Environmental Microbiology* 4:318-326
- Rotstein O. D., Kao J., Houston K. (1989a) Reciprocal synergy between *Escherichia coli* and *Bacteroides fragilis* in an intra-abdominal infection model. *Journal of Medical Microbiology* 29:269-276

- Rotstein O. D., Vittorini T., Kao J., McBurney M. I., Nasmith P. E., Grinstein S. (1989b) A soluble *Bacteroides* by-product impairs phagocytic killing of *Escherichia coli* by neutrophils. *Infection and Immunity* 57:745-753
- Ruimy R., Breittmayer V., Elbaze P., Lafay B., Boussemar O., Gauthier M., Christen R. (1994) Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44:416-426
- Sack D. A., Sack R. B., Nair G. B., Siddique A. K. (2004) Cholera. *The Lancet* 363:223-233
- Saeed M. O. (1995) Association of *Vibrio harveyi* with mortalities in cultured marine fish in Kuwait. *Aquaculture* 136:21-29
- Sakai M. (1999) Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172:63-92
- Samain J. F., Boudry P., Dégremont L., Soletchnik P., Pouvreau S., Ropert M., Bédier E., Thouard E., Haure J., Moal J., Huvet A., Van Hormhoudt A., Boulo V., Mathieu M., Costil K., Kellner K., Heude C., Lambert C., Soudant P., Nicolas J. L., Le Roux F., Renault T., Thomas H., Burgeot T., Quiniou F., Knoery J., Lelong C., Moraga D., Tanguy A., Bacher C., Lefèbvre S., Mille D., Blin J. L., Pajot R., Haffray P., Dupé F. (2003) MORTALITÉS ESTIVALES de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (MOREST), rapport 2003, synthèse intermédiaire des résultats 2001-2002-2003, IFREMER, Brest 27 p
- Sangster C. R., Smolowitz R. M. (2003) Description of *Vibrio alginolyticus* infection in cultured *Sepia officinalis*, *Sepia apama*, and *Sepia pharaonis*. *Biological Bulletin* 205:233-234
- Saouda M., Wu W., Conran P., Boyle M. D. (2001) Streptococcal pyrogenic exotoxin B enhances tissue damage initiated by other *Streptococcus pyogenes* products. *Journal of Infectious Diseases* 184:723-731
- Saulnier D., Haffner P., Goarant C., Levy P., Ansquer D. (2000) Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture* 191:133-144
- Sawabe T., Oda Y., Shiomi Y., Ezura Y. (1995) Alginate degradation by bacteria isolated from the gut of sea urchins and abalones. *Microbial Ecology* 30:193-202
- Sawabe T., Setoguchi N., Inoue S., Tanaka R., Ootsubo M., Yoshimizu M., Ezura Y. (2003) Acetic acid production of *Vibrio haliotocoli* from alginate: a possible role for establishment of abalone-*V. haliotocoli* association. *Aquaculture* 219:671-679
- Sawabe T., Thompson F. L., Heyrman J., Cnockaert M., Hayashi K., Tanaka R., Yoshimizu M., Hoste B., Swings J., Ezura Y. (2002) Fluorescent amplified fragment length polymorphism and repetitive extragenic palindrome-PCR fingerprinting reveal host-specific genetic diversity of *Vibrio haliotocoli*-like strains isolated from the gut of Japanese abalone. *Applied and Environmental Microbiology* 68:4140-4144
- Schaible U. E., Kramer M. D., Justus C. W., Museteanu C., Simon M. M. (1989) Demonstration of antigen-specific T cells and histopathological alterations in mice experimentally inoculated with *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* 57:41-47
- Schmidt A. S., Bruun M. S., Dalsgaard I., Larsen J. L. (2001) Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. *Applied and Environmental Microbiology* 67:5675-5682

- Schmidt U., Chmel H., Cobbs C. (1979) *Vibrio alginolyticus* infections in humans. *Journal of Clinical Microbiology* 10:666-668
- Schwyn B., Neilands J. B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160:47-56
- Sharma R., Anker S. D. (2002) Cytokines, apoptosis and cachexia: the potential for TNF antagonism. *International Journal of Cardiology* 85:161-171
- Shehane S. D., Sizemore R. K. (2002) Isolation and preliminary characterization of bacteriocins produced by *Vibrio vulnificus*. *Journal of Applied Microbiology* 92:322-328
- Shinoda S., Kobayashi M., Yamada H., Yoshida S., Ogawa M., Mizuguchi Y. (1987) Inhibitory effect of capsular antigen of *Vibrio vulnificus* on bactericidal activity of human serum. *Microbiology and Immunology* 31:393-401
- Simpson L. M., White V. K., Zane S. F., Oliver J. D. (1987) Correlation between virulence and colony morphology in *Vibrio vulnificus*. *Infection and Immunity* 55:269-272
- Smirnova A., Li H., Weingart H., Aufhammer S., Burse A., Finis K., Schenk A., Ullrich M. S. (2001) Thermoregulated expression of virulence factors in plant-associated bacteria. *Archives of Microbiology* 176:393-399
- Smith P., Davey S. (1993) Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonad. *Journal of Fish Diseases* 16:521-524
- Sneath P. H. A., Sokal R. R. (1973) Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification, Freeman, W. H., San Francisco (Etats-Unis CA)
- Snieszko S. F. (1974) The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *Journal of Fish Biology* 6:197-208
- Sochard M. R., Wilson D. F., Austin B., Colwell R. R. (1979) Bacteria associated with the surface and gut of marine copepods. *Applied and Environmental Microbiology* 37:750-759
- Soletchnik P., Le Moine O., Faury N., Razet D., Geairon P., Gouletquer P. (1999) Summer mortality of the oyster in the Bay Marennes-Oleron: spatial variability of environment and biology using a geographical information system (GIS). *Aquatic Living Resources* 12:131-143
- Soletchnik P., Razet D., Geairon P., Faury N., Gouletquer P. (1997) Ecophysiology of maturation and spawning in oyster (*Crassostrea gigas*): metabolic (respiration) and feeding (clearance and absorption rates) responses at different maturation stages. *Aquatic Living Resources* 10:177-185
- Soto-Rodriguez S. A., Roque A., Lizarraga-Partida M. L., Guerra-Flores A. L., Gomez-Gill B. (2003) Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana* nauplii. *Diseases of Aquatic Organisms* 53:231-240
- Spira W. M., Huq A., Ahmed Q. S., Saeed Y. A. (1981) Uptake of *Vibrio cholerae* biotype El Tor from contaminated water by water hyacinth (*eichornia crassipes*). *Applied and Environmental Microbiology* 42:550-553

- Stackebrandt E., Murray R. G. E., Truper H. G. (1988) Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives". *International Journal of Systematic Bacteriology* 38:321-325
- Steel S., Mulcahy M. F. (2001) Impact of the copepod *Mytilicola orientalis* on the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Ireland. *Diseases of Aquatic Organisms* 47:145-149
- Stevens D. L. (2000) The pathogenesis of clostridial myonecrosis. *International Journal of Medical Microbiology* 290:497-502
- Stretton S., Goodman A. E. (1998) Carbon dioxide as a regulator of gene expression in microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:79-85
- Sugita H., Asai T., Hayashi K., Mitsuya T., Amanuma K., Maruyama C., Deguchi Y. (1992) Application of ozone disinfection to remove *Enterococcus seriolicida*, *Pasteurella piscicida*, and *Vibrio anguillarum* from seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 58:4072-4075
- Sugumar G., Nakai T., Hirata Y., Matsubara D., Muroga K. (1998) *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 33:111-118
- Sun X., Mammen J. M., Tian X. (2003) Sepsis induces the transcription of the glucocorticoid receptor in skeletal muscle cells. *Clinical Science* 105:383-391
- Sutton D. C., Garrick R. (1993) Bacterial disease of cultured giant clam *Tridacna gigas* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 16:47-53
- Takahashi K. G., Nakamura A., Mori K. (2000) Inhibitory effects of ovoglobulins on bacillary necrosis in larvae of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology* 75:212-217
- Tamplin M. L., Specter S., Rodrick G. E., Friedman H. (1985) *Vibrio vulnificus* resists phagocytosis in the absence of serum opsonins. *Infection and Immunity* 49:715-718
- Thanardkit P., Khunrae P., Suphantharika M., Verduyn C. (2002) Glucan from spent brewer's yeast: preparation, analysis and use as a potential immunostimulant in shrimp feed. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18:527-539
- Thompson F. L. (2003) Improved taxonomy of the family *Vibrionaceae*. Thèse de Doctorat, Université Gent, Gent, Belgique, 270 p
- Thompson F. L., Hoste B., Vandemeulebroecke K., Swings J. (2001) Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Systematic and Applied Microbiology* 24:520-538
- Thompson J. D., Plewniak F., Thierry J., Poch O. (2000) DbClustal: rapid and reliable global multiple alignments of protein sequences detected by database searches. *Nucleic Acids Research* 28:2919-2926
- Tison D. L., Kelly M. T. (1984) *Vibrio* species of medical importance. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2:263-276

- Toranzo A. E., Barja J. L., Potter S. A., Colwell R. R., Hetrick F. M., Crosa J. H. (1983) Molecular factors associated with virulence of marine vibrios isolated from striped bass in Chesapeake Bay. *Infection and Immunity* 39:1220-1227
- Trust T. J., Courtice I. D., Khouri A. G., Crosa J. H., Schiewe M. H. (1981) Serum resistance and hemagglutination ability of marine vibrios pathogenic for fish. *Infection and Immunity* 34:702-707
- Tubiash H. S. (1974) Single and continuous exposure of the adult American oyster, *Crassostrea virginica*, to marine vibrios. *Canadian Journal of Microbiology* 20:513-517
- Tubiash H. S., Chanley P. E., Leifson E. (1965) Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. I. Etiology and epizootiology. *Journal of Bacteriology* 90:1036-1044
- Tubiash H. S., Colwell R. R., Sakazaki R. (1970) Marine vibrios associated with bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *Journal of Bacteriology* 103:271-272
- Umbreit T. H., Tripp M. R. (1975) Characterization of the factors responsible for death of fish infected with *Vibrio anguillarum*. *Canadian Journal of Microbiology* 21:1272-1274
- Urakawa H., Kita-Tsukamoto K., Steven S. E., Ohwada K., Colwell R. R. (1998) A proposal to transfer *Vibrio marinus* (Russell 1891) to a new genus *Moritella* gen. nov. as *Moritella marina* comb. nov. *FEMS Microbiology Letters* 165:373-378
- Van de Peer Y., De Wachter R. (1994) TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Applications in Biosciences* 10:569-570
- Véron M. M. (1965) La position taxonomique des *Vibrio* et de certaines bactéries comparables. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 261:5243-5246
- Verschuere L., Heang H., Criel G., Sorgeloos P., Verstraete W. (2000a) Selected bacterial strains protect *Artemia* spp. from the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. *Applied and Environmental Microbiology* 66:1139-1146
- Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P., Verstraete W. (2000b) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64:655-671
- Visick K. L., Foster J., Doino J., McFall-Ngai M., Ruby E. G. (2000) *Vibrio fischeri lux* genes play an important role in colonization and development of the host light organ. *Journal of Bacteriology* 182:4578-4586
- Vogan C. L., Costa-Ramos C., Rowley A. F. (2002) Shell disease syndrome in the edible crab, *Cancer pagurus*--isolation, characterization and pathogenicity of chitinolytic bacteria. *Microbiology* 148:743-754
- Waechter M. (2001) Recherche et identification de bactéries pathogènes au sein d'une éclosion nurserie d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, en relation avec la mortalité estivale du naissain. Thèse de Dostorat, Université de La Rochelle, La Rochelle, 211 p
- Waechter M., Le Roux F., Nicolas J.-L., Marissal E., Berthe F. (2002) Caractérisation de bactéries pathogènes de naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Comptes Rendus Biologies* 325:231-238

- Waldor M. K., Mekalanos J. J. (1996) Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 272:1910-1914
- Walter M. A., Potter S. A., Crosa J. H. (1983) Iron uptake system mediated by *Vibrio anguillarum* plasmid pJM1. *Journal of Bacteriology* 156:880-887
- Watanabe K. I., Yoshimizu M., Obana H., Kamata K. I., Sugisawa T., Sawabe T., Ezura Y. (1999) Bacteriological study on the mass mortality of cultured Hanasaki crab larvae -- causative bacterial characteristics and infection trial. *Bulletin of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University* 50:19-32
- Weinbauer M. G., Rassoulzadegan F. (2004) Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environmental Microbiology* 6:1-11
- Wertheimer A. M., Verweij W., Chen Q., Crosa L. M., Nagasawa M., Tolmasky M. E., Actis L. A., Crosa J. H. (1999) Characterization of the *angR* gene of *Vibrio anguillarum*: essential role in virulence. *Infection and Immunity* 67:6496-6509
- Whitman W. B., Coleman D. C., Wiebe W. J. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:6578-6583
- Xue Q. (1998) Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes chez l'huître plate, *Ostrea edulis*. Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest, 274 p
- Xue Q. G., Renault T., Chilmonczyk S. (2001) Flow cytometric assessment of haemocyte sub-populations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph. *Fish and Shellfish Immunology* 11:557-567
- Yamamoto S., Harayama S. (1995) PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1104-1109
- Yamamoto S., Harayama S. (1998) Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48 Pt 3:813-819
- Yii K.-C., Yang T.-I., Lee K.-K. (1997) Isolation and characterization of *Vibrio carchariae*, a causative agent of gastroenteritis in the groupers, *Epinephelus coioides*. *Current Microbiology* 35:109-115
- Yoh M., Bi Z., Matsuyama J., Nagayama K., Honda T. (2003) Effect of environmental conditions on proteins secreted by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11. *Microbiology and Immunology* 47:1-6
- Yoshida S., Ogawa M., Mizuguchi Y. (1985) Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*. *Infection and Immunity* 47:446-451
- Zorrilla I., Arijo S., Chabrillon M., Diaz P., Martinez-Manzanares E., Balebona M. C., Morinigo M. A. (2003) *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. *Journal of Fish Diseases* 26:103-108

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique
AMP : Adénosine Mono Phosphate
ARN : Acide Ribonucléique
ATCC : American Type Culture Collection
CAS : Chrome Azurol S
CECT : Colección Española de Cultivos Tipos
CIP : Collection de l'Institut Pasteur
CRB : Collection de Ressources Biologiques
CT : Toxine cholérique (Cholera Toxin)
EDMAS : Eau de Mer Artificielle Stérile
EDTA : Ethylène Diamine Tétracétique Acid
FAFLP : Polymorphisme par fluorescence de longueur de fragments amplifiés (Fluorescent Amplification Fragment Length Polymorphism)
FAO : Food and Agriculture Organization
FITC : Isothiocyanate de Fluorescéine (Fluorescein Isothiocyanate)
GFP : Green Fluorescent Protein
HGMF : Hydrophobic Grid Membrane Filtration
IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
LB : Luria Bertani
LBCB : Laboratoire de Biotechnologies et de Chimie Bio-organique (ex LGPC)
LGP : Laboratoire de Génétique et Pathologie
LGPC : Laboratoire de Génie Protéique et Cellulaire
LMG : Laboratorium voor Mikrobiologie, Gent
MOREST : MORtalités ESTivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*
NO : Oxyde nitrique (Nitric Oxide)
NTG : N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
OsHV1 : Herpèsvirus des huîtres (Oyster Herpesvirus)
pb : paires de base
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)
pH : Potentiel Hydrogène
REPAMO : REseau de PATHologie des MOLLusques
RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RTX : Repeats in Toxin
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
TAE : Tris Acétate EDTA
TCBS : Thiosulfate Citrate Bile Saccharose
TCP : Toxin Coregulated Pilus
TDH : Hémolysine Thermostable Directe (Thermostable Direct Hemolysin)
TRH : Hémolysine proche de la TDH (TDH-Related Hemolysin)
UFC : Unités Formant Colonies
UV : Ultra-Violet
VHML : *Vibrio harveyi* Myovirus-Like