

MEMOIRE PRESENTE A L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE
POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

TAXONOMIE ET VIRULENCE DE VIBRIONS
PATHOGENES D'HUITRES CREUSES *CRASSOSTREA*
GIGAS

par

Frédérique LE ROUX

Le 27 octobre 2004

Jury

Pr. Gilles Bœuf, rapporteur
Pr. Jean Swings, rapporteur
Pr. Colin Tinsley, rapporteur
Dr. Corinne Dorel Flamant, examinatrice
Dr. Maurice Héral, examinateur
Pr. Germain Gillet, président



Remerciements

Je souhaite exprimer ma reconnaissance aux étudiants, chercheurs, techniciens, collaborateurs précieux sans qui ce travail n'aurait pas vu le jour. Merci de m'avoir donné tant de plaisir à apprendre et transmettre mon métier.

L'avenir est aujourd'hui pluriel avec une attention particulière pour Johan, Yann, Simo, Didier, Denis, Cyrille, Laurence, Nicole, Anne, Fabiano, Steph et Claude.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté de corriger et amender ce mémoire :

Gilles Bœuf, défenseur passionné de la biologie marine à l'Université de Paris VI

Jean Swings, microbiologiste fervent réformateur de la taxonomie des vibrions

Colin Tinsley, adepte de la soustraction génomique chez les bactéries pathogènes

Corinne Dorel-Flamant, observatrice du comportement social des bactéries

Maurice Héral, directeur scientifique de l'Ifremer, fidèle supporter de ce projet

Germain Gillet, « eucaryotiste » confirmé témoin de toute cette histoire

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Génétique et Pathologie de la station Ifremer de la Tremblade dirigé successivement par Messieurs Jean Pierre Flash, André Gérard et Philippe Gouletquer, que je remercie pour leur soutien ainsi que l'ensemble du personnel de la station.

Je dédie ce travail à ceux qui ont été « les petits cailloux » me permettant de ne pas perdre la route: Bernard Genetet, Michèle Ottmann, Jacques Daillie, Alain Sergeant, Laura Corbo, Monique Buisson, Irène Joab, Shannon Kenney, Manolo Gouy, Franck Berthe, Henri Grizel, Brian Austin, Didier Mazel et bien sur Mimi et ma petite Zoë.



SOMMAIRE

I- CURRICULUM VITAE

I.A- Cursus universitaire

I.B- Cursus professionnel

I.C- Formations suivies depuis mon intégration à l'Ifremer

I.D- Production scientifique

I.D.1- Articles dans revues à comité de lecture

I.D.2- Articles dans actes de colloque

I.D.3- Articles de synthèse

I.D.4- Article de vulgarisation et interview

I.D.5- Colloques, congrès, conférence et posters

I.D.6- Rapports intermédiaires ou de convention

I.D.7- Recherches de financement

I.E- Collaborations

I.F- Enseignements

I.F.1- Enseignement à l'Université

I.F.2- Formation continue

I.F.3- Rédaction de supports pédagogiques

I.F.4- Encadrement

II- RESUME DES TRAVAUX ANTERIEURS

II.A- Thèse

Article 1 : *Corbo et al., 1994*

Article 2 : *Le Roux et al., 1996*

II.B- Premier stage post-doctoral

Revue 1 : *Le Roux et Joab, 1998*

II.C- Second stage post-doctoral

Article 4 : *Berthe et al., 2000*

Article 9 : *Le Roux et al., 2001*

Article 10 : *Audemard et al., 2002*

III-LE MODELE VIBRIOSE CHEZ *CRASSOSTREA GIGAS*

III.A- Introduction générale

III.B- Vibriose et aquaculture

III.C- Taxonomie des vibrions

III.D- Virulence des vibrions

III.D.1- Colonisation et invasion de l'hôte

III.D.1.a- Mobilité et chimiotactisme

III.D.1.b- Adhérence et colonisation

III.D.1.c- Production d'enzymes hydrolytiques

III.D.1.d- Invasion

III.D.1.e- Les sidérophores

III.D.2- Altération de l'hôte

III.D.2.a- Les exotoxines

III.D.2.b- Les endotoxines

III.D.3- Régulation

III.D.4- Quorum sensing

III.D.5- Plasticité génomique

III.D.5.a- Les plasmides

III.D.5.b- Les phages

III.D.5.c- Les transposons

III.D.5.d- Les intégrons

III.E- Projet de recherche

III.E.1- Objectifs

III.E.2- Résultats préliminaires

III.E.3- Origine de la collection de vibrions

III.E.4- Taxonomie

III.E.4.a- Choix d'une approche polyphasique

III.E.4.b- Identification taxonomique des souches

III.E.4.c- Description de *Vibrio crassostreae*

III.E.4.d- Autres espèces en cours de caractérisation

III.E.4.e- Le Centre de Ressource Biologique du LGP la Tremblade

III.E.5- Etude d'un modèle d'infection expérimental à *Vibrio splendidus*

III.E.5.a- Description des lésions tissulaires et des altérations cellulaires

III.E.5.b- Recherche d'exotoxines

III.E.5.c- Le séquençage complet du génome de la souche 32

III.E.5.d- Soustraction génomique

III.E.5.e- Sécrétion d'homosérine lactone

III.E.6- Utilisation du modèle dans le cadre d'une approche intégrative

III.E.6.a- Facteurs génétiques

III.E.6.b- Facteurs trophiques

III.E.6.c- Facteurs environnementaux

III.E.6.d- Recherche de marqueurs immunitaires

III.E.6.e- Développement d'un modèle d'infection à *Vibrio aestuarianus*

Article 12 : *Waechter et al., 2002*

Article 13 : *Le Roux et al., 2002*

Article 15 : *Le Roux et al., 2004*

Article 16 : *Gay et al., 2004a*

Article 17 : *Gay et al., 2004b*

Article 18 : *Faury et al., 2004*

III.E.7- Discussion et perspectives

III.E.8- Conclusions

III.F- Références bibliographiques



I- CURRICULUM VITAE

Frédérique Le ROUX

Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Ifremer)
Laboratoire de Génétique et Pathologie
BP 133, 17390 La Tremblade (France)
Tél. : 05 46 36 98 42 ; Fax. : 05 46 36 37 51 ; Emel : fleroux@ifremer.fr

Née le : 17 mai 1967 à : Pont l'abbé (Finistère)
Célibataire, un enfant

I.A- Cursus universitaire

Maîtrise de Biologie Cellulaire (mention assez bien) Université Joseph Fourier, Grenoble, 1990. Au cours de cette formation, j'ai effectué deux stages pratiques dans le laboratoire de Virologie, du professeur J.M. Seigneurin à la faculté de médecine de Grenoble sur le thème "Interaction entre le virus d'immunodéficience humaine (VIH) et le virus d'Epstein Barr (EBV), détection de EBV dans des sérums de patients immunodéprimés".

D.E.A. de Biologie Cellulaire, Moléculaire et Sciences de la Santé (mention bien) Université des Sciences, Rennes, 1991. Mon stage de recherche effectué au Laboratoire d'Immunologie Fondamentale de Rennes sous la direction du Pr. N. Genetet portait sur la mise au point d'une technique d'hybridation *in situ* sur cellules en suspension pour la détection d'ARNs en cytofluorométrie et son application aux ARNs HLA de classe I.

Doctorat de l'Université Claude Bernard-Lyon I, spécialité Biologie Cellulaire et Moléculaire (mention très honorable avec félicitations du jury), 1995. J'ai effectué mon travail de thèse au laboratoire de Virologie moléculaire (INSERM U412) à l'Ecole Normale Supérieure de Lyon sous la direction du Dr A. Sergeant sur le thème « Latence et réactivation du virus d'Epstein Barr : contrôle de l'expression de EB1, régulateur clé du cycle productif ».

I.B- Coursus professionnel

Post-doctorat effectué entre décembre 1996 et février 1998 au laboratoire d'expression virale et proliférations malignes associées (UA 1301 CNRS), Institut Gustave Roussy, Villejuif, sous la direction du Dr I. Joab et sur le thème: " Caractérisation des propriétés d'un variant de EB1, Zser206". Séjour de trois mois aux Etats Unis dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr S. Kenney au Lineberger Cancer Institute, Chapel Hill, North Carolina.

Post-doctorat effectué entre mars 1998 et juin 2000 sous la codirection du Dr M. Gouy, laboratoire de Biométrie et Biologie évolutive (CNRS UMR 5558) Université Claude Bernard Lyon et du Dr F. Berthe, laboratoire de génétique et pathologie de l'Ifremer La Tremblade et sur le thème « Taxonomie moléculaire du parasite *Marteilia refringens* ».

Depuis mon admission à l'Ifremer en juillet 2000 en qualité de cadre de recherche (C1), j'exerce mes activités au sein du laboratoire de génétique et pathologie à la Tremblade. Le thème de recherche que je dirige consiste en l'étude de vibrions pathogènes d'espèces d'intérêt aquacole au niveau taxonomie et virulence.

I.C- Formations suivies depuis mon intégration à l'Ifremer

2000 - Ecole de microbiologie moléculaire fondamentale du CNRS, Carry le Rouet

2000 - Formation Ifremer à la rédaction de projet européen dans le cadre du 5^{ème} PCRD

2002 - Ecole de biologie moléculaire de l'Ifremer, Banyuls

2002 - Ecole de microbiologie moléculaire fondamentale du CNRS, Carry le Rouet

2004 - Ecole de biologie moléculaire de l'Ifremer, Banyuls

I.D- Production scientifique

I.D.1- Articles dans revues à comité de lecture

- 1) Corbo L., **Le Roux F.**, Sergeant A. (1994). The EBV early gene product EB2 transforms rodent cells through a signalling pathway involving c-myc. *Oncogene*, 9 : 3299-3304.
- 2) **Le Roux F.**, Sergeant A., Corbo L. (1996). Epstein-Barr virus (EBV) EB1/Zta protein provided in trans and competent for the activation of productive cycle genes, does not activate the BZLF1 gene in the EBV genome. *Journal of General Virology*, 77 : 501-509.

- 3) **Le Roux F.**, Audemard C., Barnaud A., Berthe F. (1999). DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Marine Biotechnology*, 1, (6) : 588-597.
- 4) Berthe F.C., **Le Roux F.**, Peyretailade E., Peyret P., Rodriguez D., Gouy M., Vivarès C. (2000) Nucleotide sequence of the small subunit ribosomal RNA gene of *Marteilia refringens*, parasite of the blue mussel, *Mytilus edulis*, with taxonomic implications. *Journal of Eucaryotic Microbiology*, 47 (3) : 288-293.
- 5) Cochennec N., **Le Roux F.**, Berthe F.C., Gérard A. (2000). Detection of *Bonamia Ostrea* based on small subunit ribosomal probe. *Journal of invertebrate pathology*, 76 : 26-32.
- 6) Audemard C., Barnaud A., Collins C.M., **Le Roux F.**, Sauriau P., Coustau C., Blachier P., Berthe F.C. (2001). Claire ponds as an experimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies: new perspectives. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*; 257 (1): 87-108.
- 7) Zrncic S., **Le Roux F.**, Oraic D., Berthe F.C. (2001). First record of *Marteilia* sp. in mussels, *Mytilus galloprovincialis* in Croatia. *Disease of Aquatic Organisms* 44(2):143-148.
- 8) 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. *FEBS Letters*, 500, 64-70.
- 9) **Le Roux F.**, Lorenzo G., Peyret P., Audemard C., Figueras A., Gouy M., Berthe F.C. (2001) Molecular Evidence for the Existence of Two Species of *Marteilia* in Europe. *Journal of Eucaryotic Microbiology*, 48 (4) : 449-454.
- 10) Audemard C., **Le Roux F.**, Barnaud A., Collins C.M., Sautour B., Sauriau P., de Montaudouin X., Coustau C., Combes C., Berthe F.C. (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.
- 11) Kleeman S., **Le Roux F.**, Berthe F.C., Adlard (2002). Specificity of PCR and in situ hybridisation assays designed for detection of *Marteilia sydneyi* and *Marteilia refringens*. *Parasitology*, 125 : 131-141.
- 12) Waechter M., **Le Roux F.**, Nicolas J.L., Marissal E., Berthe F. (2002). Caractérisation de bactéries pathogènes de naissains d'huitre creuse *Crassostrea gigas*. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 325 : 1-8.
- 13) **Le Roux F.**, Gay M., Lambert C., Waechter M., Poubalanne S., Chollet B., Nicolas J.L., Berthe F.C. (2002) Comparative analysis of *Vibrio splendidus* related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic Living Resources*, 15 : 251-258.
- 14) Fabioux C., Pouvreau S., **Le Roux F.**, Huvet, A. (2004). The oyster *vasa*-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochemical and biophysical research communications*, 315 : 897-904.

- 15) **Le Roux F.**, Gay M., Lambert C., Nicolas J.L., Gouy M., Berthe F.C. 2004. Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus* related strains based on *gyrB* gene sequences. *Disease of Aquatic Organisms*, 58 : 143-150.
- 16) Gay M., Berthe F.C., **Le Roux F.** 2004a. Screening of *Vibrio* isolates towards the development of an experimental infection model in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Disease of Aquatic Organisms*, 59 : 49-56.
- 17) Gay M., Renault T., Pons A. M., **Le Roux F.** 2004b. Two *Vibrio splendidus*-related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*, taxonomy and host alterations. *Disease of Aquatic Organisms*, 62 : 65-74.
- 18) Faury N., Saulnier D., Thompson F. L., Gay M., Swings J., **Le Roux F.** 2004. *Vibrio crassostrea* sp.nov., isolated from the hemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 2137-2140.

I.D.2- Articles dans actes de colloque

Corbo L., Buisson M., **Le Roux F.**, Sergeant A. (1993) The Epstein Barr Virus and associated diseases. Vol 225, Turz T. *et al.* (eds). pp.51-56

Gay M, Saulnier D, Faury N, **Le Roux F.** Vers une étude épidémiologique des vibrioses. Colloque Styli, Nouvelle Calédonie, mai 2003. Sous presse.

I.D.3- Articles de synthèse

Le Roux F. and I. Joab. (1998). Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma. *EBV report*, 5, 53-57.

Le Roux F. et I. Joab. (1999). Virus d'Epstein-Barr et cellules épithéliales. Les virus Herpes humains. Coordinateurs V. Marechal, M. Fegondy, J.C. Nicolas, collection option bio, Elsevier. Gap. P 417-429.

Paillard C., **Le Roux F.**, Borrego J. Bacterial disease in molluscs, a review. *Aquatic Living Resources*. Sous presse.

Berthe F. **Le Roux F.**, Adlard, Figueras A. Martellosis, a review. *Aquatic Living Resources*. Sous presse.

I.D.4- Article de vulgarisation et interview

Le Roux F., I. Joab. (1999). Le virus d'Epstein-Barr et le carcinome indifférencié du nasopharynx. *Virologie*, **3**, 113-123.

Le Roux F., M. Gay, 2002. Interview Radio France Bleue La Rochelle, 27 août 2002. Sujet : « Les mortalités estivales et la bactériologie ».

I.D.5- Colloques, congrès, conférence et posters

Audemard C., Barnaud A., **Le Roux F.**, Sauriau P.G., Cousteau C. & F. Berthe (1999). Experimental transmission of *Marteilia refringens* in claire ponds. Conference F. A. F. P., Rhodes 20-25 septembre 1999

Audemard C., Barnaud A., **Le Roux F.**, Sauriau P. G., Cousteau B., Sautour B. & F. Berthe (2000). New insights on *Marteilia refringens* life-cycle. World Aquaculture 2000. 2-6 mai 2000. Nice. France.

Berthe F., Audemard C. & **F. Le Roux** (2000). Mollusc health management : the paradigm of marteiliosis. Aquaculture Canada 2000 - 17^{ème} rencontre annuelle de l'Association Aquacole du Canada, 28 mai au 02 juin 2000, Moncton, Canada

Berthe F., Boudry P., **Le Roux F.** & M. Hine (2000). Molecular typing can move the taxonomic boundaries : how far should we go ? Risk analysis conference, Congrès de l'Office International des Epizooties, 6-11 février 2000, Paris, France.

Cochennec N., Reece K., **Le Roux F.** & M. Hine (2000). Sequence of the small subunit ribosomal RNA gene of *Bonamia ostreae*, and *Bonamia sp.* : taxonomic implications and development of DNA detection assays. World Aquaculture 2000. 2-6 mai 2000. Nice. France.

Cochennec N., Reece K. & **F. Le Roux** (2000). Investigation the phylogenetic relationships of *Bonamia* spp. 1^{er} Workshop du Groupe « Mikrocell » Ifremer, Paris, Février 2000.

Le Roux F., Lorenzo G., Szncic S., Audemard C., Oraic D., Figueras A. & F. Berthe (2000). Molecular epidemiology of *Marteilia* species in Europe. World Aquaculture 2000. 2-6 mai 2000. Nice. France

Le Roux F. (2000). Molecular epidemiology. 1^{er} Workshop du Groupe « Mikrocell » Ifremer, Paris, Février 2000.

Le Roux F. (2000). Molecular basis of *in situ* hybridization. Theory and Practice. Third Technical Workshop of E. U. National Reference Laboratories for Molluscs Diseases. 4- 8 December 2000, La Tremblade, France.

Le Roux F. (2000). Bacterial infections of *Crassostrea gigas* juveniles. Third Technical Workshop of E. U. National Reference Laboratories for Molluscs Diseases. 4-8 December 2000, La Tremblade, France.

- Thébault A., **Le Roux F.**, Berthe F., Cochennec N., Chollet B., Waechter M., Fleury P. G. & J. Mazurié (2000). Epidemiological strategy for investigating abnormal mortalities in marine mollusc aquaculture in France. World Aquaculture 2000. 2-6 mai 2000. Nice. France
- Audemard C., **Le Roux F.**, Sauriau P. G., Sautour B., Comges C., Coustau C., Blanchier P. & F. Berthe, 2001. Pipetman et bottes en caoutchouc à la recherche d'hôte(s) de *Marteilia refringens*. IFREMER – Journées conchylicoles, Nantes, 3 – 4 avril 2001
- Cochennec-Laureau N., **Le Roux F.** & al. Les parasites du groupe « Mikrocell » : qui est qui ? IFREMER – Journées conchylicoles, Nantes, 3 – 4 avril 2001
- Cochennec-Laureau N., **Le Roux F.**, Berthe F. & M. Hine, 2001. Could *Mikrocytos roughleyi* be a mis-classified haplosporidian ? World Aquaculture – The annual International Meeting of Was. January 21-25, Florida : p. 61
- Cochennec-Laureau N., Hine M., Reece K., Bower S., **Le Roux F.** & F. Berthe, 2001. Mikrocell parasites : the key to their discrimination. . 10th International Conference of the EAFP « Disease of fish and shellfish » 9th – 14th september 2001, Trinity College Dublin, Ireland
- Le Roux F.**, Audemard C., Cochennec N., Thébault A. & F. Berthe, 2001. Epidémiologie moléculaire des espèces *Marteilia* en Europe. IFREMER – Journées conchylicoles, Nantes, 3 – 4 avril 2001
- Le Roux F.**, 2001. Pipetman et bottes en caoutchouc à la recherche d'un hôte intermédiaire pour le parasite *Marteilia refringens*. Séminaire de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon, 6 décembre 2001.
- Le Roux F.**, 2001. Biodiversité de la flore *vibrionacae* associée aux mortalités estivales de *Crassostrea gigas*. Rencontre Roscoff sur le Pôle ouest de Génomique Fonctionnelle, 10-11 décembre 2001, Roscoff.
- Thébault A. & F. **Le Roux**, 2001. Epidémiologie moléculaire du parasite *Marteilia refringens*. Forum AFSA, 18 mai 2001, Paris.
- Berthe F., Audemard C. & F. **Le Roux**, 2002. Exploration du cycle de *Marteilia refringens*, parasite paramyxéen de l'huître plate, *Ostrea edulis*. 40^{ème} réunion annuelle du Groupement des Protistologues de Langue Française. 29-31 mai 2002, La Rochelle.
- Gay M. & F. **Le Roux**, 2002. . Caractérisation de Vibrio pathogène d'huîtres creuses. Journées MOREST, Brest, 13-15 novembre 2002.
- Gay M. & F. **Le Roux**, 2002. . Caractérisation de Vibrio pathogène d'huîtres creuses. Ecole de Microbiologie fondamentale, Carry le Rouet, 23-27 septembre 2002.
- Gay M. & F. **Le Roux**, 2002. Caractérisation de Vibrio pathogène d'huîtres creuses. Ecole de Biologie Moléculaire, Banyuls, 10-14 juin 2002
- Le Roux F.** & M. Gay, 2002. Caractérisation de Vibrio pathogène d'huîtres creuses. Réseau d'interactions durables du CNRS, Montpellier, 20 novembre 2002.

- Engelsma M. Y., Van Banning P., Van Gool, A., **Le Roux F.**, Berthe F. & O. L. Haenen, 2003. *Bonamia ostreae* infections in flat oysters (*Ostrea edulis*) from Lake Grevelingen, The Netherlands, 15 years after introduction. Malta, 11th International Conference of the EAFP, 21-26 septembre 2003.
- Fabioux C., Huvet A., **Le Roux F.**, Le Pennec M. & J. C. Cochard, 2003. Oyster vasa-like gene : a specific marker of the germ cell lineage in *Crassostrea gigas*. 95th Annual Meeting National Shellfisheries Association, New Orleans, Louisiana, April 13-17, 2003.
- Gay M., Lazaille E., Renault T., Berthe F., Gouy M. & **F. Le Roux**, 2003. A new French connection : deux *Vibrio* coopèrent pour tuer l'huître creuse. Journées Conchylicoles, Ifremer Nantes, 12-13 mars 2003.
- Lancelot G., Lazaille E., Gay M., Choquet G., Saulnier D. & **F. Le Roux**, 2003. Caractérisation de *Vibrio* pathogènes d'espèces aquacole : pertinence des outils. Journées Conchylicoles, Ifremer Nantes, 12-13 mars 2003
- Le Roux F.**, Gay M., Saulnier D., 2003. Quorum sensing : ou comment les bacteries se causent.... Journées Conchylicoles, Ifremer Nantes, 12-13 mars 2003.
- Saulnier D., Gay M., Mazel D. & **F. Le Roux**, 2003. Caractérisation de *Vibrio* pathogènes d'espèces aquacole : génomique et post-génomique. Journées Conchylicoles, Ifremer Nantes, 12-13 mars 200
- Gay M., Renault T. & **F. Le Roux**, 2003. Characterization of *Vibrio* isolated from *Crassostrea gigas* spat suffering summer mortality outbreaks. III^e Congrès International des Sociétés Européennes de Malacologie "Les mollusques dans la recherche actuelle", La Rochelle 24-27 juin 2003.
- Gay M., Saulnier D., Faury N. & **F. Le Roux**, 2003. Vers une étude épidémiologique de vibrioses. Styli 2003, 23 Mai – 9 juin 2003, Nouvelle-Calédonie
- Gay M., Renault T. & **F. Le Roux**, 2003, A new French connection : two *Vibrio splendidus*-related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*, Malta, 11th International Conference of the EAFP, 21-26 septembre
- Giraud E., Blanc G., Bouju-Albert A. & **F. Le Roux**, 2003. Rapid identification of *Vibrio anguillarum* by rRNA-based species-specific PCR. EAFP Annual Meeting, Septembre 2003 (Poster)
- Renault T., Nicolas J. L., Garnier M., Soletchnik P., Le Moine O., Courtis C., Saulnier D. & **F. Le Roux**, 2003. Dynamor-Pathologie. Séminaire Morest, 26-28 novembre 2003
- Saulnier D., **Le Roux F.**, Nicolas J. L., Cochennec N. & C. Goarant, 2003. Développement d'outils diagnostics pertinents de vibriens pathogènes. Séminaire Morest, 26-28 novembre 2003

I.D.6- Rapport intermédiaires ou de convention

- Le Roux F.** (1999). Rapport de mission Croatie, 30 août – 6 septembre, Coopération Franco-Croate.
- Renault T., **Le Roux F.**, Berthe F., Robert M., Chollet B. & A. Gérard, 2002. Etude des agents pathogènes et épidémiologie. Contrat Région Poitou-Charentes 2000-2006. Convention N°2001-RPC-A-212 «Gestion durable des productions ostréicoles : les apports de la pathologie» 17 p.
- Gouletquer P, **Le Roux F.**, Goarant C., 2003. Rapport d'étape du Contrat du Ministère de la Recherche « Collections Ressources Biologiques *Vibrios* pathogènes» : 4 p.
- Renault T., **Le Roux F.**, Berthe F., Arzul I., Miossec L., Robert M. & B. Chollet, 2003. Action 1 : Epidémiologie analytique et descriptive des agents pathogènes, étude de la diversité des virus de type herpès. Action 2 : Etude des relations hôtes/agents pathogènes, pathogénèse des infections à virus de type herpèsvirus. Contrat Région Poitou-Charentes 2000-2006. Convention 2002-RPC-A-180. Programme 4: « Gestion des productions ostréicoles : les apports de la pathologie » :23 p.

I.D.7- Recherche de financement

- Le Roux F.** (2001) Pathogenic vibrios from bivalve molluscs : taxonomy and virulence characterisation. Appel d'offre Europe 5 ème PCRD, action Quality of life QoL-2.2.3. Rejeté (note 3.5/5)
- Le Roux F.** (2002) Développement d'une souche de *Vibrio* pathogènes d'espèces d'intérêt aquacole. Appel d'offre Ministère de la recherche/CNRS/Ifremer. Accepté.
- Le Roux F.** (2002) Deux souches de *Vibrio* coopèrent pour tuer *Crassostrea gigas* : rôle des phéromones dans cette « *Vibrio* connection ». Programme national « environnement côtier », action de recherche thématique N°5, PNEC-ART5. Rejeté
- Le Roux F.** (2003) Séquençage complet du génome d'un *Vibrio* pathogène de *C. gigas*. Appel d'offre Génomole de l'Institut Pasteur. Accepté.
- Le Roux F.** (2003) Approche de génomique soustractive pour la caractérisation de la virulence de *Vibrio* pathogènes. Appel d'offre génomole ouest (GIS). Rejeté
- Le Roux F.** (2004) Approche d'hybridation soustractive et de génétique pour la caractérisation de la virulence de *Vibrio* pathogènes. Appel d'offre génomole ouest (GIS). Accepté.

I.E- Collaborations

Le projet MOREST (Mortalités estivales) fédère 16 laboratoires et stations marines (IFREMER, CNRS, Universités) autour d'une approche multidisciplinaire de la problématique des mortalités estivales de l'huître creuse *C. gigas*. Ce projet est financé par les régions Normandie, Bretagne, Poitou Charente, pour une durée de 4 ans. L'hypothèse de travail est que ces mortalités résultent des interactions entre trois compartiments : l'environnement, l'hôte et les pathogènes. Ce projet fédère donc l'ensemble des compétences nécessaires à l'étude de ces interactions : compétences en génétique, physiologie, immunologie, pathologie, écotoxicologie, environnement ainsi que celles des structures régionales et professionnelles. Le groupe microbiologie de la Tremblade que j'anime est impliqué dans trois des 8 actions qui constituent le programme. La première action est le développement d'outils taxonomiques permettant d'identifier les *Vibrio* potentiellement pathogènes de *C. gigas*, la seconde est l'étude des facteurs de pathogénicité de souches de *Vibrio* isolées au cours d'épisodes de mortalité enfin la dernière action concerne la variation de la réponse de *C. gigas* aux infections en fonction de paramètres environnementaux, physiologiques ou génétiques.

Le projet DESANS (Défi santé *stylirostris*) fédère une dizaine de laboratoires Ifremer (LAC Nouvelle Calédonie, COP Tahiti, LGP La Tremblade, CREMA La Rochelle, LPI Brest, DRIM Montpellier) ou autres (Institut Pasteur, et Institut de recherche et du développement de Nouvelle Calédonie, Université de Townsville en Australie) autour d'une approche itérative visant à étudier deux pathologies bactériennes responsables de mortalités de crevettes dans des élevages de grossissement (épidémiologie, pathogénie, mécanisme de défense). Ce programme est financé en partie par les provinces de la Nouvelle-Calédonie pour une période de 4 ans (2003-2007). Dans le cadre de ce projet je prévois d'encadrer avec mes collègues C. Goarant (LAC, Nouvelle Calédonie) et D. Saulnier (LGP, La Tremblade) une thèse financée par l'Ifremer et les provinces de la Nouvelle-Calédonie de 2004 à 2007 sur le thème : Recherche de facteurs de virulence exprimés par *Vibrio nigrispulchritudo*, pathogène de crevettes pénaïdes et application à des études d'intérêt épidémiologique.

Développement d'une souche de vibrions pathogènes d'espèces d'intérêt aquacole dans le cadre de l'appel d'offre « Collection de ressource biologique » (CRB) du Ministère de la Recherche (2003-2004). Ce projet que j'anime regroupe 3 équipes Ifremer (LGP La Tremblade, LPI Brest, LAC Nouvelle-Calédonie) et une équipe CNRS (UBO, Brest). Notre objectif est d'établir une collection de souches de

vibrions caractérisée en terme de spéciation (phénotype et génotype), et virulence (infection expérimentale). Cette collection regroupe des isolats pathogènes des principales espèces marines aquacoles (mollusques, crevettes, poissons) favorisant des démarches expérimentales commune pour l'étude et la comparaison des vibrions chez ces animaux. Dans le cadre de ce projet, nous avons mis au point de nouveaux outils moléculaires pour la caractérisation taxonomique des souches de vibrions (article 15). Ces outils sont aujourd'hui comparés à ceux développés par F. Thompson au laboratoire de microbiologie (LMG) de Gand en Belgique, avec qui nous collaborons depuis un an (Faury *et al.*, 2004).

Séquençage complet du génome d'un vibrions pathogène de *C. gigas*, souche LGP32

à la génopole de l'Institut Pasteur de Paris, en collaboration avec l'équipe du Dr D. Mazel. Actuellement, seulement trois génomes de vibrion ont été intégralement séquencés, *V. cholerae* (TIGR) *V. vulnificus* (NHRI Taiwan), et *V. parahaemolyticus*, trois pathogènes pour l'homme qui appartiennent à la même radiation du genre *Vibrio*. L'espèce que nous séquençons appartient à l'autre radiation majeure des vibrions, qui compte un certain nombre de pathogènes de poissons (e.g. *V. salmonida*) et d'animaux marins, mais aussi des symbiotes, comme *V. fischeri* (dont le génome est partiellement séquencé par Integrated Genomics Inc.). L'intérêt scientifique de ce projet est fondamental, puisqu'il devrait permettre d'identifier des éléments génétiques nouveaux impliqués dans la pathogénicité pour les animaux marins et comprendre leur mode d'action, ainsi que la possibilité d'appréhender les mécanismes évolutifs des génomes des vibrions. Un chercheur post-doctorant, M. Zouine, financé par l'Ifremer (janvier 2004-2005) est en charge de ce travail dans l'équipe de D. Mazel.

Dans le cadre de mon détachement à l'Institut Pasteur dans l'équipe du Dr Mazel de septembre 2004 à septembre 2005 je vais prendre en charge l'approche de génomique fonctionnelle qui consiste à inactiver les gènes candidats ayant un rôle potentiel dans la pathogénicité de la souche et en étudier le phénotype *ex vivo* et *in vivo* (infection expérimentale).

I.F- Enseignements

I.F.1- Enseignement à l'Université

En 1998 et 1999 j'ai participé aux enseignements de travaux pratiques de biologie moléculaire pour les étudiants de maîtrise de biologie à l'Université de La Rochelle.

En 2000 je suis intervenue en travaux dirigés de biologie moléculaire de Licence de biologie à l'Université de La Rochelle.

I.F.2- Formation continue

Depuis 6 ans, j'organise et anime des sessions de formation continue en biologie moléculaire à l'Ifremer : ateliers pratiques et école de biologie moléculaire. Ces cours émanent d'échanges sur le réseau de communication intranet (biomol@ifremer.fr) et sont illustrés par des manuscrits adaptés à chaque niveau.

Année	Type	Sujets	Niveau	Durée	Nb d'inscrits
1998	Atelier pratique	PCR Hybridation <i>in situ</i> Etude de polymorphisme	1	5 jours	15
1999	Atelier pratique	PCR Hybridation <i>in situ</i> Etude de polymorphisme	1	5 jours	10
1999	Atelier théorique	Contrôle de l'expression des gènes	2	5 jours	10
2001	Atelier pratique	PCR Hybridation <i>in situ</i> Etude de polymorphisme	1	5 jours	15
2001	Atelier théorique	Base de génomique	2	2 jours	40
2002	Atelier théorique	Génomique, génomique fonctionnelle et post-génomique	3	5 jours	30
2003	Atelier pratique	Clonage et séquençage	1	5 jours	15
2004	Atelier théorique	Biologie moléculaire et évolution	3	5 jours	25

I.F.3- Rédaction de supports pédagogiques

Le Roux F. (1998) Cours de biologie moléculaire : PCR, hybridation *in situ*, PCR *in situ*.
Manuscrit de 30 pages. Formation interne Ifremer

Le Roux F. (1999) Cours de biologie moléculaire : Bases de l'hérédité, l'ADN est le matériel génétique, du phénotype au génotype, contrôle de l'expression des gènes. Manuscrit de 25 pages. Formation interne Ifremer

Le Roux F. (1999) Cours de biologie moléculaire : Bases théoriques, réaction de polymérisation en chaîne, hybridation *in situ*, travaux pratique. Manuscrit de 30 pages. Formation interne Ifremer

Le Roux F. (2001) Initiation à la biologie moléculaire Manuscrit de 30 pages. Formation interne Ifremer

I.F.4- Encadrement

Etudiant de BTS

Isabelle Crenon - Etudiante de BTS (juillet-août 1998). Sujet: Ribotypage de bactéries pathogènes de crevettes

Etudiant de Licence professionnelle

Guénaëlle Lancelot - Etudiante en licence professionnelle de l'Université de Bordeaux (janvier-juin 2002). Sujet: développement de biotests pour la caractérisation de vibrions pathogènes de naissain d'huître creuse.

Eric Lazaille - Etudiant en licence professionnelle de l'Université de Bordeaux (janvier-juin 2003). Sujet: taxonomie et virulence de deux souches de *Vibrio aestuarianus* pathogènes de *C. gigas*.

Technicien

Nadine Lesgure (CRTS-Rennes), octobre 1991, hybridation *in situ* et cytométrie

Bruno Chollet (Ifremer-LGP-La Tremblade), juin 1998, hybridation *in situ*

Maeva Robert (Ifremer-LGP-La Tremblade), juin 2002, séquençage

Nicole Faury (Ifremer-LGP-La Tremblade), mars-mai 2003, taxonomie moléculaire

Dominique Ansquer (Ifremer-LAC- Nouvelle-Calédonie), novembre 2003, mise au point du colony blotting chez *V. peneicidae*

Etudiant de licence, maîtrise

Pierre Yves Bougrier - Etudiant de maîtrise, Université de Lyon (juillet-août 1992). Sujet: induction du promoteur du gène EB1 par les membres de la famille Jun/Fos

Nathalie Grenon - Etudiante en licence, Université de Lyon (juillet-août 1994). Sujet: transfection stable de cellules lymphoïdes

Saravanne Poubalanne – Etudiant de master, India (septembre 2000- janvier 2001) Sujet: genotypage de souches *Vibrio splendidus*.

Fabien Magne - Etudiant de maîtrise, Université de Clermont Ferrand (juin-septembre 2001) Sujet: séquençage de gènes d'intérêt phylogénétique chez *Vibrio*.

Stéphanie Faure - Etudiante de maîtrise, Université de Clermont Ferrand (juin-septembre 2002) Epidémiologie du parasite *Marteilia refringens*.

Encadrement d'étudiant vétérinaire

Antoine Barnaud - Etudiant vétérinaire (mai-juin 1998). Sujet: détection du parasite *Marteilia refringens* par PCR et hybridation *in situ*

Encadrement d'étudiant en DEA

Encadrement du DEA de Corinne Audemard (1998). Sujet : cycle biologique du parasite *Marteilia refringens*.

Encadrement de doctorants

- Encadrement scientifique des travaux de thèse de Corinne Audemard (1999-2002), dirigée par F. Berthe. Sujet : cycle biologique du parasite *Marteilia refringens*. Les travaux effectués durant cette période ont fait l'objet de 3 publications (N°3, 6, 10)
- Encadrement scientifique des travaux de thèse de Nathalie Cochenec (1999-2002), dirigée par H. Grizel. Sujet : Taxonomie du parasite de l'huître plate, *Bonamia ostrea* ; Ce travail a fait l'objet d'une publication (N°5)
- Encadrement scientifique des travaux de thèse de Magalie Waechter (1997-2000), dirigée par F. Berthe. Sujet : caractérisation d'un vibrion pathogène de *C. gigas*. Les travaux effectués durant cette période ont fait l'objet de deux publications (N°12, 13)
- Direction scientifique de la thèse de Mélanie Gay de septembre 2001 à 2004. (Financement Ifremer- Région Poitou Charente). Sujet: vibrions pathogènes de *Crassostrea gigas*: agosnisme et antagonisme. Le doctorat sera soutenu en octobre 2004 en présence des Professeurs Austin B. et Tinsley C. à titre de rapporteurs, du Pr Miramand et du docteur Gatesoupe J., à titre d'examineurs et de Madame A. M. Pons (directrice administratif) et moi-même (directeur scientifique). Les travaux de thèses ont donné lieu à 4 publications (15, 16, 17, 18).

Participation à des comités de suivi de thèse

Membre du comité de suivi de thèse de Gwenaëlle Choquet qui effectue sa thèse au laboratoire d'interaction hôte-pathogène (Université de Brest) sous la direction scientifique de Christine Paillard. Sujet de thèse : Mécanisme de virulence de *Vibrio tapetis*.

Membre du comité de suivi de thèse de Yannick Labreuche qui effectue sa thèse au laboratoire Physiologie et Écophysiologie des Mollusques Marins (Ifremer Brest), sous la direction de J.L. Nicolas. Sujet de thèse : recherche de facteurs de virulence de vibrions pathogènes de bivalves et modulation de leur expression en fonction de paramètres abiotiques.

Participation à des jurys de thèse

Membre du jury de thèse vétérinaire d'Antoine Barnaud. Etude de la dynamique du parasite *Marteilia refringens* chez son hôte *Ostrea edulis*. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, 2 juillet 2001.

Membre du jury de thèse vétérinaire d'Anne Thébault. Epidémiologie dans le cas de mortalités anormales de coquillages : exemple des coques du Croisic. Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons Alfort, mai 2001.

Membre du jury de thèse de science de Franck Berthe. Taxinomie et épidémiologie moléculaire du parasite *Marteilia refringens* : intérêt pour la gestion du risque sanitaire en conchyliculture. Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand le 17 mai 2002.

II- RESUME DES TRAVAUX ANTERIEURS

II.A- Résumé des travaux de thèse

Latence et réactivation du virus d'Epstein-Barr : contrôle de l'expression de EB1, régulateur clé du cycle productif

Le virus d'Epstein Barr (EBV) est un herpèsvirus humain associé à une pathologie bénigne : la mononucléose infectieuse et à au moins deux pathologies malignes : le lymphome de Burkitt et le carcinome du nasopharynx.

Des lignées de cellules B transformées par EBV ont été établies et constituent un système modèle pour étudier le rôle de EBV dans la prolifération dérégulée des cellules B ainsi que les mécanismes moléculaires de la latence et de la réactivation virale. Un cycle viral productif peut être activé en traitant les cellules par l'ester de phorbol (TPA), le butyrate (BA) ou les anti-immunoglobulines de type G (anti-IgG). Ces agents ont pour cible deux gènes viraux inactifs pendant la latence et dont les produits sont les facteurs de transcription EB1 et R. Le modèle jusqu'alors admis suggérait que le promoteur PZ du gène EB1 était directement activé par le TPA (Le Roux *et al.*, 1996 ; Figure 1). En effet, ce promoteur contient un site AP-1 sur lequel peuvent se fixer sous forme dimérique les facteurs de transcription de la famille Jun/Fos, activables par le TPA. Une fois traduit, EB1 pouvait activer la transcription de nombreux gènes précoces en se fixant sur des séquences spécifiques dans les promoteurs de ces gènes (ZRE), séquences dont l'accessibilité était présumée non restreinte. Parmi ces promoteurs il y a avait le promoteur PZ qui contient en plus du site AP1 deux sites ZRE, et le promoteur PR à partir duquel sont transcrits des messagers bicistroniques permettant la traduction de R et potentiellement de EB1. Le modèle décrit précédemment résultait d'expériences de transfection en système hétérologue i.e. promoteur cloné dans un plasmide en amont d'un gène reporteur et transfecté dans des cellules B, EBV négatives.

L'objectif principal de mon travail de thèse a été d'évaluer ce modèle dans des lignées cellulaires B infectées par EBV. Il s'agissait donc d'étudier la régulation de certains promoteurs dans le contexte du génome viral. Pour cela j'ai recherché si des membres de la famille Jun/Fos étaient impliqués dans l'activation du promoteur PZ ; si le promoteur PZ était activable par une protéine EB1 compétente pour l'induction du cycle viral productif ; si EB1 et R étaient traduits à partir des messagers bicistroniques.

L'induction du cycle lytique par le TPA, BA ou les anti-IgG est initiée par une expression de cFos puis de EB1. Par des expériences de transfection j'ai montré que cFos est capable d'activer le promoteur PZ dans le contexte d'un plasmide mais pas dans le contexte du génome viral. La protéine EB1, produite à partir d'un plasmide, est capable d'activer tous les gènes du cycle lytique sauf le gène codant pour EB1 (Le Roux *et al.*, 1996). Le facteur EB1 induit la transcription du messenger bicistronique initiée au promoteur PR à partir duquel R est efficacement traduit mais pas EB1.

Le fait que le messager EB1/R ne soit pas fonctionnellement bicistronique a des conséquences importantes pour la régulation de EB1. Si ce messager est traduit préférentiellement en R, le siège de la régulation de l'expression de EB1 est principalement PZ. Il est donc fondamental de comprendre les mécanismes de régulation de ce promoteur dont l'activation apparaît être un événement clé de la réactivation de EBV. Mes résultats indiquent fortement qu'un système de régulation du promoteur PZ empêche son activation par différents transactivateurs comme Jun/Fos ou EB1.

Dans le génome viral, le promoteur PZ est probablement soumis à une régulation au niveau de la chromatine impliquant par exemple des phénomènes de méthylation de l'ADN. Des travaux ont montré que le génome EBV est présent dans les cellules sous forme hyperméthylé et que le traitement des cellules par des drogues réduisant la méthylation de l'ADN augmente la fréquence d'induction spontanée du virus dans ces cellules. Cette conformation du génome viral ne permet pas ou peu l'accessibilité des promoteurs inductibles par les transactivateurs EB1 ou Jun/Fos.

Dans le contexte d'un plasmide transfecté dans les cellules EBV positives, le promoteur PZ est inductible par Jun/Fos mais pas par EB1. Cette régulation négative peut impliquer un répresseur qui agirait spécifiquement sur le promoteur PZ. En se fixant au promoteur il empêcherait la fixation de EB1 sur ces sites ZRE. Par contre si EB1 se fixe sur ces sites ZRE ce répresseur bloquerait la transactivation par EB1 en l'empêchant par exemple de contacter les facteurs généraux de transcription. Dans les deux cas ce mécanisme serait lié à un état cellulaire dépendant de la présence d'EBV.

Etude des propriétés transformantes de la protéine EB2

En parallèle j'ai participé à un travail, mené par mon responsable scientifique le Dr Laura Corbo, sur l'étude des relations entre le proto-oncogène cMyc et le virus EBV dans les lymphomes de Burkitt EBV positifs. Nos résultats indiquent que la protéine cMyc est capable d'activer le promoteur du gène codant pour la protéine virale EB2, promoteur qui contient 5 sites potentiels de fixation pour cMyc (Corbo *et al.*, 1993). A l'aide de mutants de délétion et par mutagenèse dirigée, nous avons montré que cMyc régule l'expression du gène EB2 via ces sites. Le promoteur PM de ce gène viral est un des rares modèles de gène régulé par cMyc. Il constitue donc un système expérimental permettant d'étudier la fonction transactivatrice de cMyc.

Dans la progression des tumeurs associées à EBV seuls les gènes viraux exprimés pendant la latence étaient considérés comme potentiellement impliqués. En effet, les produits de plusieurs gènes de la latence sont nécessaires à l'immortalisation des lymphocytes B *ex vivo*. Cependant les gènes précoces du cycle lytique pourraient être importants dans la genèse de certains cancers associés à EBV. Cette hypothèse est soutenue par le fait que la présence d'anticorps dirigés contre certains gènes précoces précède souvent le développement de certains cancers associés à EBV et sera développée plus précisément dans la prochaine partie (stage post-doctoral, Institut Gustave Roussy).

Parmi les gènes précoces de EBV, BMLF1 code pour la phosphoprotéine nucléaire EB2. Bien que la fonction de cette protéine n'était pas encore établie, plusieurs résultats semblaient indiquer que EB2 influence l'expression d'un gène en augmentant la quantité de protéine par un mécanisme indépendant de

la transcription. Les mécanismes post-transcriptionnels jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes et dans la prolifération cellulaire.

Nous avons montré que la protéine EB2 est capable de stabiliser le produit du gène cMyc dans les cellules Hela. Ce résultat a confirmé le rôle de régulateur post-transcriptionnel attribué à EB2 et nous a conduit à émettre l'hypothèse d'une potentialité oncogénique de ce gène. Le gène BMLF1 a été exprimé dans les lignées de fibroblastes Rat1 et NIH3T3. Il transforme très efficacement ces deux types de cellule (Corbo *et al.*, 1994). Afin d'étudier les mécanismes moléculaires à la base de ces transformations, nous avons recherché les molécules cibles de la protéine EB2 dans les cellules Rat1 transformées par EB2. Pour cela, nous avons analysé dans ces cellules la variation des oncoprotéines cFos et cMyc dont la régulation a lieu au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. La quantité de cMyc est augmentée dans les cellules transformées. De plus, nous avons observé que l'effet transformant de la protéine EB2 est inhibé quand le partenaire de cMyc, cMax, est surexprimé. Ces deux résultats indiquent qu'au moins une protéine de la famille Myc est une cible de la transformation induite par EB2.

ARTICLE 1 : Corbo & al., 1994



The EBV early gene product EB2 transforms rodent cells through a signalling pathway involving c-MYC

Laura Corbo, Frédérique Le Roux & Alain Sergeant

Unité de Virologie Humaine, Ecole Normale Supérieure de Lyon, INSERM, U412, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France

Epstein-Barr virus (EBV) is a ubiquitous human herpesvirus associated with several neoplasia. We present evidence here that the protein EB2, an EBV posttranscriptional activator, has transforming properties not only when expressed in established cell lines such as Rat1 or NIH3T3 but also in primary rat fibroblasts (REF). EB2 transformation in Rat1 cells correlates with an increase in the steady-state level of the cellular oncogenic protein c-Myc, and cotransfection of a plasmid expressing Max suppresses the transformation. These results implicate c-Myc in EB2-mediated cell transformation and help define the pathway by which this EBV early protein causes transformation.

Introduction

Epstein-Barr virus (EBV) (Epstein *et al.*, 1964), a herpes virus widespread in the human population, is the cause of infectious mononucleosis and B-cell lymphomas in immunocompromised individuals (Young *et al.*, 1989). EBV is strongly associated with the African Burkitt's lymphoma (eBL) and nasopharyngeal carcinoma (NPC) (Magrath, 1990; Miller, 1990). EBV has also been detected in Hodgkin's disease, in peripheral T-cell lymphoma (PTL) (Pallesen *et al.*, 1991b; Su *et al.*, 1991) and in AIDS-associated lymphoma (Pallesen *et al.*, 1991a). EBV infection of human B lymphocytes *in vitro* yields immortalized B lymphoblasts in which the viral genome is maintained in a latent state as an autonomously replicating episome. Studies on viral infection *in vitro* have identified viral proteins expressed in latently infected cells, including six nuclear antigens (EBNAs) and three membrane proteins (LMPs) Kieff & Liebowitz, 1990). Up to now, only the EBV gene products expressed during latency have been considered to be potentially involved in the progression of EBV-associated malignancies (Wang *et al.*, 1985; Baichwall & Sugden, 1988). Indeed some of these genes are important for EBV-mediated immortalization of B-lymphocytes *in vitro* (Hammerschmidt & Sugden, 1989; Kaye *et al.*, 1993; Tomkinson *et al.*, 1993). However, some of the early gene products could also be potentially important for EBV-associated cancers, in the case of abortive viral infection or reactivation. In line with the hypothesis, it must be noted that an EBV gene, BARF1, associated with the viral productive cycle has been shown to transform murine fibroblasts (Wei & Ooka, 1989). Moreover, the appearance of

antibodies against the early viral antigens, indicative of EBV reactivation, is used both as a diagnostic and a prognostic marker for the development of EBV-related cancers (Zeng *et al.*, 1982; Joab *et al.*, 1991; Pallesen *et al.*, 1991b,c). Among the early genes of EBV, the BMLF1 gene codes for a nuclear phosphoprotein (Wong & Levine, 1989) called EB2 (Chevallier-Greco *et al.*, 1989). Although the exact function of this protein is not yet completely elucidated, several data indicate that EB2 affects gene expression by increasing the relative protein concentration by a transcription-independent mechanism(s) (Buisson *et al.*, 1989; Kenney *et al.*, 1989). Posttranscriptional control mechanisms play an important regulatory role in gene expression and in cell proliferation (Hinnebusch & Hochstrasser, 1993). Recently, several proteins involved in post-transcriptional processes, such as the control of the rate of protein synthesis, have been shown to act as oncogenes (Lazaris-Karatzas *et al.*, 1990; Karomilas *et al.*, 1992; Tatsuka *et al.*, 1992). On the basis of these data, we postulated that EB2 might also have oncogenic properties by modulating the level of certain cellular gene products.

In this report we show that the Epstein-Barr virus early protein EB2 transforms the established rodent cell lines Rat-1 and NIH3T3 and induces drastic morphologic and growth changes in rat embryo fibroblasts (REF). To understand by which mechanisms EB2 exerts its transforming activity, we demonstrated that EB2 expression in Rat1 cells leads to a significant increase in the amount of c-Myc protein and that overexpression of Max, a competitive inhibitor of Myc, prevents the EB2-induced transformation. Our results indicate that the c-myc gene product may participate in the pathway(s) used by this EBV early protein to transform Rat-1 cells.

Results

The EBV early gene EB2 has transforming properties when expressed in established cell lines Rat1 or NIH3T.

The immortalized rodent cell lines Rat-1 and NIH3T3 are susceptible to one-step transformation when transfected with single viral or cellular oncogenes. To explore the ability of EB2 to transform these cells, we cotransfected the EB2-expressing vector pcdM (Mane *et al.*, 1989) which contains the BMLF1 cDNA linked to the SV40 early promoter or the pcd vector as control, with a selectable marker (pSV2neo) in Rat and NIH3T3 cells. Forty-eight hours after the transfection, cells were plated in soft agar and transformation was evaluated by the ability of the transfected cells to form isolated colonies (Lugo *et al.*

Table 1 Soft agar colony formation in rodent cells after transfection with the EB2-expressing vector pcdM, pcdM plus c-Ha-Ras and pcd control

Transfected DNA	Colonies per 10^5 transfected cells		
	Rat1 ^a	NIH3T3 ^b	REF ^b
pcd (5 μ g)	3	10	18
pcdM (5 μ g)	900	540	300
pcdM (5 μ g) + c-Ha-Ras (5 μ g)			312

Secondary REFs. Rat1 and NIH3T3 cells were plated at 5×10^5 cells per 100 mm dish 24 h before transfection and were transfected with the indicated plasmids and 500 ng of pSV2neo plasmid using the calcium phosphate method (Wigler *et al.*, 1978). Forty-eight hours after the transfection 10^5 , 10^4 and 10^3 cells were seeded into normal medium containing 0.3% agar. Colonies were counted 10–14 days after the plating. The colony numbers represent the average of ^(a)three and ^(b)two experiments.

1990). After 2 weeks, macroscopic colonies were present in the plates containing cells transfected with pcdM, but not in the control plates (Table 1). Transfected cells were also grown in monolayer and selected for resistance to the antibiotic G-418 for 2 weeks. Individual *neo*-resistant colonies were isolated and expanded for further analysis. Transfection of the EB2-expressing vector elicited a complete morphological transformation in both Rat1 and NIH3T3 cells. Only data on Rat1 cultures are presented below. Transformed cells had an increased refractivity and exhibited a variety of morphological types, including cells growing as floating aggregates. Most of these cell clones (80%) grew in a criss-cross fashion with no contact inhibition, formed multiple foci in monolayer cultures, and showed a very high efficiency of colony formation when cloned in soft agar (Figure 1). The expression of the EB2 protein in transformed clones was determined by Western blotting. In Figure 2 are shown five representative clones: the expression level of EB2 varies between clones and appears to correlate with the rate of colony formation in soft agar (data not shown), suggesting a correlation between the level of EB2 expression and the degree of transformation.

Altered growth properties of EB2-transformed REFs

To further study the oncogenic properties of EB2, we also evaluated its capacity to immortalize or transform primary rat embryo fibroblasts (REF) either alone or in combination with the oncogene c-Ha-ras (Shic & Weinberg, 1982). EB2-transformed REFs, when seeded in soft agar immediately after transfection, formed large colonies (Table 1). When grown in monolayer in the presence of G-418 as selection agent, antibiotic-resistant colonies exhibiting altered morphology were generated (Figure 3). However, the transformed REFs had a limited proliferative potential. Indeed, we were not able to establish permanent cell lines when individual colonies were taken and expanded. We next tested the combination of EB2, which is a nuclear protein, with an activated c-Ha-Ras. In two separate experiments, the transformation efficiencies of EB2 alone and in combination with c-Ha-Ras were similar (see Table 1). Thus EB2 does not cooperate with c-Ha-Ras to completely transform primary cells. One interpretation of this result could be that EB2 and Ras activate the same convergent pathway or that one pathway inhibits the other.

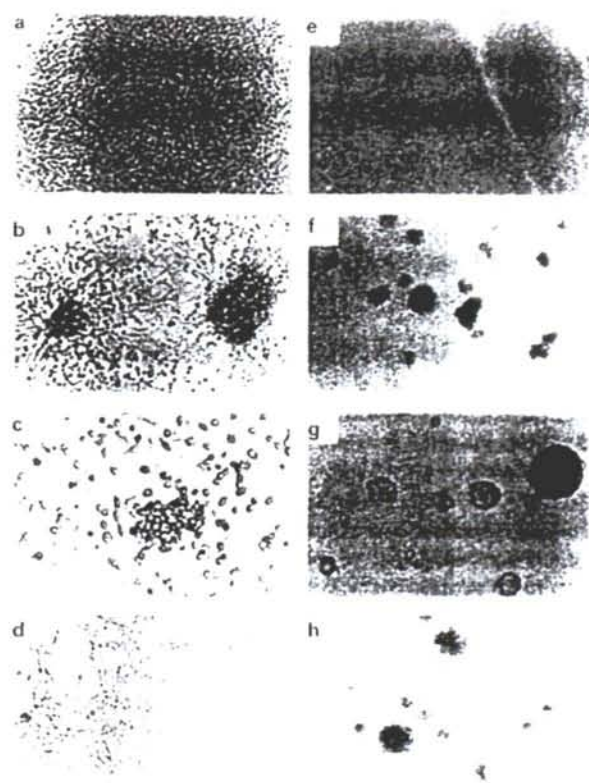


Figure 1 Growth characteristics of EB2-transfected Rat1 cells. Phase-contrast micrographs of cell lines derived from isolated G-418-resistant colonies grown in monolayer (a–d) and plated in soft-agar (e–h). Rat1 control cells (a,e) and randomly selected EB2-transfected clones (b,d,f,h). Rat1 cells were plated at 5×10^5 cells per 100 mm dish 24 h before transfection. The cells were transfected with 5 μ g of pcdM or pcd plasmids and 500 ng of pSV2neo plasmid. Transfected cells were grown in monolayer and selected for resistance to G418 (400 mg ml⁻¹) for 2 weeks. Fifty individual G-418 resistant colonies were isolated and expanded for further analysis. Their capacity for anchorage-independent growth was determined as described in the Materials and methods section.



Figure 2 Expression of EB2 protein in Rat1-transformed clone and in Rat1 control cells was measured by Western blot analysis using a rabbit polyclonal antibody to bacterially synthesized EB2. The blot was incubated with anti-EB2 rabbit polyclonal antibody then incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulins and visualized by chemiluminescence.

EB2 expression correlates with an increased expression of c-Myc protein

Identification of cellular proteins directly regulated by EB2 would help to unravel the mechanisms of EB2

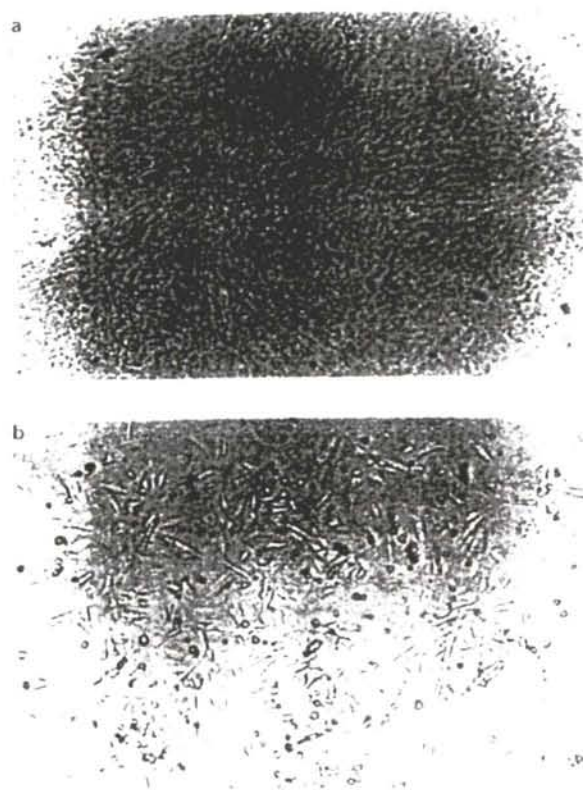


Figure 3 Morphological characteristics of EB2-transfected rat embryo fibroblasts. Secondary REFS were transfected with 5 μ g of pcdM or pcd plasmids and 500 ng of pSV2neo plasmid and G-418 colonies were scored 2 weeks later. (a) REF control (b) EB2-transfected REFS

induced cell transformation. Proto-oncogenes whose production is controlled at posttranscriptional levels and which affect the control of transcription and progression through the cell cycle, could be involved in this process. To test this possibility directly, we examined whether the EB2 transformation was associated with an increase in the steady-state amount of several proto-oncoproteins, such as c-Jun, c-Fos and c-Myc. Expression of these proteins in EB2-transformed vs control Rat1 cells was analysed by immunoblotting. Of the three proto-oncogenes analysed, only the level of c-Myc protein was increased in EB2 transformed clones and no c-Myc protein was detectable in Rat1 control cells (Figure 4a). These results demonstrate that expression of EB2 in transformed clones increases the amount of endogenous c-Myc protein. These data are in agreement with other experimental results showing that transient EB2 expression in HeLa cells results in an increase in the steady-state amount of endogenous c-Myc protein (Figure 4b and (Corbo *et al.*, 1993). This increase is not the result of an increase of *c-myc* mRNA (data not shown).

Max overexpression blocks transformation by EB2

Experiments were designed to further substantiate the implication of c-Myc in the EB2-mediated cell transformation. c-Myc heterodimerization with its partner protein Max is required for both transcriptional activation and transformation (Eisenman, 1991; Kato *et al.*, 1992; Amati *et al.*, 1993). Although Max

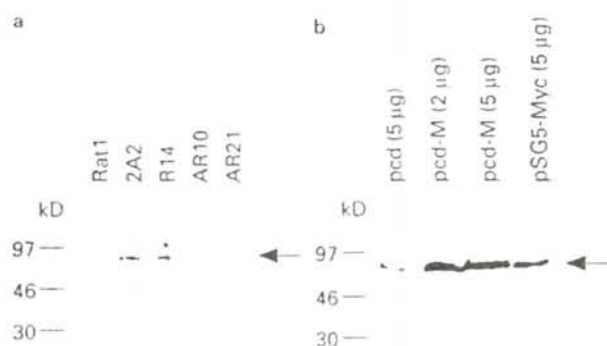


Figure 4 (a) Steady-state level of c-Myc protein in the EB2-transformed clones and in Rat1 control cells was measured by Western blot analysis using a rabbit polyclonal antibody to bacterially synthesized c-Myc and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulins and visualized by chemiluminescence (b) Effect of EB2 transient expression on endogenous c-Myc protein in HeLa cells. 5×10^5 HeLa cells were transfected with the indicated plasmids. c-Myc-expressing plasmid, pSG5-Myc, was used as positive control. Human c-Myc was detected using the anti human c-Myc monoclonal antibody 9E10 and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse immunoglobulins and visualized by chemiluminescence

preferentially dimerizes with Myc, it can also form homodimers and, as such, inhibits both the transcriptional activation and the transformation by Myc (Prendergast *et al.*, 1991; Mukherjee *et al.*, 1992). To assess whether Max can affect the ability of EB2 to transform, we cotransfected in Rat1 cells the EB2-expressing vector pcdM and a Max-expressing vector. As measured by the soft agar colony formation assay, in two separate experiments, a striking reduction in EB2-induced transformation was observed when wild-type Max was overexpressed (Figure 5). We also performed experiments in which we cotransfected the EB2-expression vector with the Max mutant dMaxPLZ (Billaud *et al.*, 1993). This Max mutant protein is unable to dimerize and, as shown in Figure 5, it has no effect in colony formation over the fibroblast control. To rule out the possibility that the inhibition of EB2-induced transformation was due either to a toxic effect of Max overexpression or to Max-mediated repression of the expression of the EB2, the following experiments were done. After transfection, the Rat-1 cells were exposed to G-418 for 10–15 days before being plated in soft agar. The viability of both test and control cells was similar when the G-418 selection was done before plating in agar (not shown). Again, a striking reduction in EB2-induced transformation was observed when wild-type Max was cotransfected but not when the Max mutant dMaxPLZ was coexpressed. Moreover, the EB2 protein was expressed to the same level in Rat1 cells transfected with pcdM alone, or in Rat1 cells cotransfected with pcdM and Max or with pcdM and dMaxPLZ (not shown).

Discussion

We have shown that the EBV early gene product EB2 can transform Rat1 and NIH3T3 cells and induce drastic morphologic and growth changes in primary rat fibroblasts. Transformation of primary cells by a single

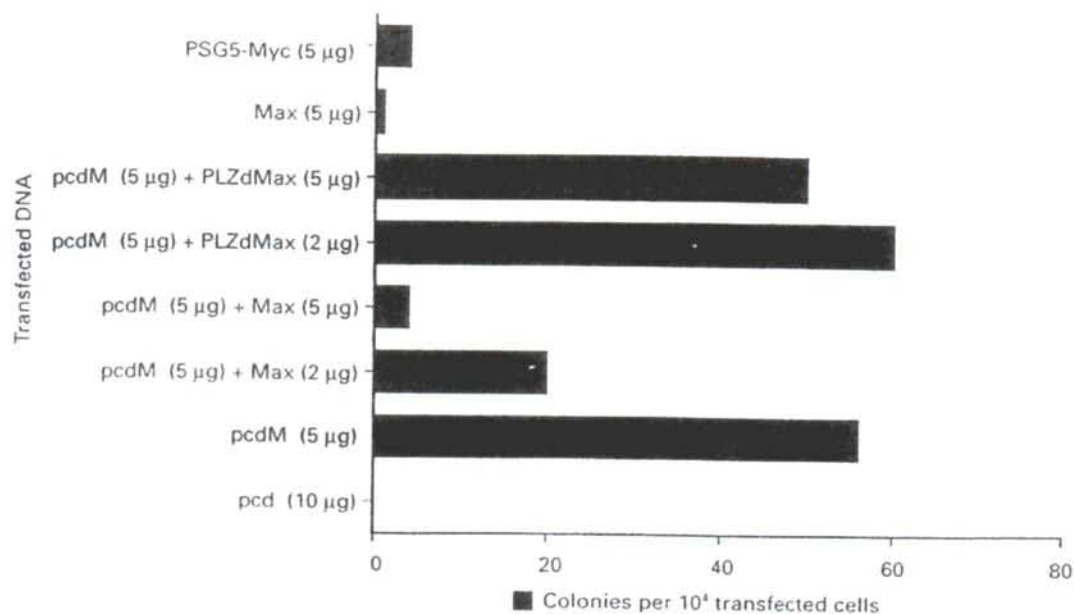


Figure 5 Overexpression of Max protein blocks EB2 transformation. Soft agar colony assay in Rat1 cells transformed either with EB2 in the presence of wild-type Max or of the dMaxPLZ mutant. pSG5-Myc was used as control. Colony numbers represent a summary from two experiments

oncogene, contrary to established cell lines, is generally inefficient and requires complementation between members of two classes of oncogenes. One group includes proteins involved in cytoplasmic signal transduction pathways: growth factors (*sis*, *int-2*), growth factor receptors (*erbB*, *fms*, *kit*) and transducers of growth factors responses (*src*, *ras*, *raf*). The second group consists of transcription factors that mediate growth factor-induced gene expression (*fos*, *jun*, *myc*) (Hunter, 1991). The observation that EB2 is able to transform primary rat fibroblasts but cannot induce their permanent growth suggests that an additional function is necessary to generate the fully transformed phenotype. When EB2 was cotransfected with an active c-Ha-Ras we obtained the same effect. One possible interpretation to explain this result could be that EB2 exerts its transforming activity through a signalling pathway that is shared or convergent on that of Ras.

We present evidence for the involvement of c-Myc in EB2-mediated transformation by using different approaches. First we demonstrate that EB2-transformed Rat-1 clones have an increased amount of endogenous c-Myc protein, but not of other nuclear oncogenes such as c-*jun* and c-*fos*, indicating specificity in transformation effect. We have also shown that transient expression of EB2 in HeLa cells also results in a strong increase of c-Myc protein. Finally, by performing experiments in which both Max and EB2-expressing vectors were simultaneously introduced into the Rat-1 cells, we also show the suppression of the transforming phenotype. However cotransfection of the dMaxPLZ mutant (Billaud *et al.*, 1993) which is unable to dimerize, had no effect on colony formation (Figure 5), suggesting that suppression results from competition between the Myc/Max heterodimers and non functional Max homodimers for DNA-binding sites. The inhibition of EB2-induced transformation was not due to a toxic effect of Max overexpression, because the viability of test and control cells both after the G-

418 selection and before plating in agar were similar. Thus the suppression of c-Myc function affects the growth of EB2-transformed Rat-1 cells in soft agar, but not their growth in monolayer.

The finding that Max overexpression can inhibit EB2-induced transformation indicates that c-Myc could play a role in EB2-induced transformation. However, an increased Myc protein level cannot be the sole transforming effect of EB2 because Myc overexpression is not transforming in this assay (Figure 5). It is possible that EB2 also alters the Myc protein qualitatively thereby modifying its biological activity or that other cellular components in addition to Myc are required for transformation.

We do not know by which mechanisms EB2 transforms. We can however speculate that the function of EB2 in the EBV viral cycle is to enhance the efficiency of viral protein production by affecting cellular mRNA processing (splicing and polyadenylation), as has been demonstrated for the early protein ICP27, the HSV-1 EB2 homologue (McLauchlan *et al.*, 1992; Sandri-Goldin & Mendoza, 1992; Phelan *et al.*, 1993). It is noteworthy that ICP27 also transforms Rat1 cells (L. Corbo, unpublished results). EB2 expression in rodent fibroblasts could thus result in the increased synthesis of one or several cellular proteins involved in cell growth regulation. c-Myc is a good candidate for such a protein because its expression is enhanced in EB2-transformed cells and because Max overexpression inhibits the transforming effect of EB2. Moreover it is well known that c-Myc is an essential downstream effector of other oncogenes, like *ras* (Sklar *et al.*, 1991) and ABL (Sawyers *et al.*, 1992) and that alteration of c-Myc expression contributes to the malignant phenotype in several human cancers (Cole, 1986; Marcu *et al.*, 1992). In conclusion, our results indicate that the EBV early gene product EB2 has oncogenic properties and thus could be involved in the evolution of EBV-related malignancies.

Materials and methods

Plasmid vectors

The EB2-expressing vector pcdM (Manet *et al.*, 1989) contains the BMLF1 cDNA linked to the SV40 early promoter. The pSV2neo plasmid, which confers G418 resistance in mammalian cells, was used as selectable marker. The Max plasmid was constructed by cloning the Sall fragment derived from the pHeBo-CMV-Max plasmid (Gu *et al.*, 1993) (graciously provided by Prof. R. Dalla Favera, Columbia University, New York, USA), containing the Max cDNA under the control of the CMV early promoter in the Sall digested pSG5 vector (Stratagene). The dMaxPLZ plasmid (Billaud *et al.*, 1993) (a gift from M. Billaud, International Agency of Cancer, Lyon) contains a mutant cDNA, in which a proline replaced the first leucine of the dMax Zip, cloned into the mammalian expressing vector pJ4Δ. The pSG5myc contains the entire exon 2 and exon 3 of the human *c-myc* gene under the control of the SV40 early promoter (a gift from I. Chapsal-Crenon ENS, Lyon).

Cell culture

Early-passage rat embryo fibroblasts (REF) were prepared as described (Land *et al.*, 1983) by mincing and dissecting 14-day-old rat embryos by trypsin. The suspension was passed through a gauze mesh to isolate single cells, collected with foetal bovine serum (FCS; Gibco) and centrifuged at 1500 r.p.m. The cell pellet was plated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco) supplemented with 10% FCS. Rat1, NIH3T3 and HeLa cell lines were routinely grown in DMEM supplemented with 10% FCS.

Transfections

Secondary REFs, Rat1 and NIH3T3 cells were plated at 5×10^5 cells per 100 mm dish 24 h before transfection and were transfected with the indicated plasmids and pSV2neo at 1:10 molar ratio, using the calcium phosphate method (Wigler *et al.*, 1978), and pUC vector (Stratagene) was used as carrier to bring the total plasmid DNA to 15 μ g in each transfection. Forty-eight hours after the transfection cells were trypsinized and reseeded into four dishes and selected for resistance to G-418 (Gibco, 400 μ g ml⁻¹). Independent G-418-resistant clones were isolated 2 weeks later and mass propagated for further analysis.

Assay for anchorage-independent growth

Forty-eight hours after the transfection 10^5 , 10^4 and 10^3 cells were seeded into normal medium containing 10% FCS and 0.3% agar. Colonies were counted 10 to 14 days after the initial plating. For analysis of Max overexpression on EB2 transformation, after the cotransfection the Rat-1 cells

were selected for G-418 resistance for 10–15 days. G-418 resistant cells were trypsinized, counted and plated in agar at a density of 2×10^3 – 2×10^4 per 60 mm dish in duplicate and colonies counted at 2 weeks. The viability of test and control cells after the G-418 selection and before placing in agar was measured.

Transient transfection

To study the effect of EB2 transient expression on endogenous c-Myc protein 5×10^5 HeLa cells were transfected with the plasmids indicated in Figure 4b. After 48 h the cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and whole cell protein extracts were subsequently prepared as described below.

Immunoblot analysis

Cells (5 – 10×10^6) were washed three times with cold phosphate-buffered saline solution, incubated with 100 ml of lysis buffer as described (Mikaelian *et al.*, 1993). 1/10 lysate was subjected to electrophoresis on a 10% polyacrylamide-SDS gel. The separated proteins were transferred to a nitrocellulose-membrane (Schleicher & Schuell) by electroblotting. Equal amounts of protein were loaded per lane as measured by Bradford assay and confirmed by Red Ponceau staining of the transferred membrane. To measure the expression of EB2 protein in Rat1-transformed clones and in Rat1 control cells the blot was incubated with anti-EB2 rabbit polyclonal antibody to bacterially synthesized EB2 (kindly provided by Nathalie Duran, ENS, Lyon), then incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulins (Amersham). Steady-state level of c-Myc protein in the EB2-transformed clones and in Rat1 control cells was detected using a rabbit polyclonal antibody to bacterially synthesized c-Myc (kindly provided by Isabelle Chapsal-Crenon, ENS, Lyon). Human c-Myc was detected using the anti human c-Myc monoclonal antibody 9E10 (Oncogene Science, Inc, NY) and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse immunoglobulins (Amersham). The proteins were visualized by means of the enhanced chemiluminescence kit (Amersham) as instructed by the supplier.

Acknowledgements

We thank Conrad B. Bluink and Monique Buisson for reading the manuscript. We thank M. Billaud, I. Chapsal-Crenon and R. Dalla Favera for various constructs. Chapsal-Crenon and N. Duran for rabbit polyclonal antibodies against c-Myc and EB2 respectively. This work was supported by INSERM (contract no 910117 to A.S. by the Association pour la recherche sur le cancer (contract no 6810 to A.S.), and by FNCLCC.

References

- Amati, B., Brooks, M.W., Levy, N., Littlewood, T.D., Evan, G.I. & Land, H. (1993). *Cell*, **72**, 233–245.
- Baichwall, V.R. & Sugden, B. (1988). *Oncogene*, **2**, 416–467.
- Billaud, M., Isselbacher, K.J. & Bernards, R. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 2739–2743.
- Blackwood, E.M. & Eisenman, R.N. (1991). *Science*, **251**, 1211–1217.
- Buisson, M., Manet, E., Trescol-Biemont, M.-C., Gruffat, H., Durant, B. & Sergeant, A. (1989). *J. Virol.*, **63**, 5276–5284.
- Cole, M.D. (1986). *Annu. Rev. Genet.*, **20**, 361–384.
- Corbo, L., Buisson, M., Le Roux, F. & Sergeant, A. (1993). *The Epstein-Barr Virus and Associated Diseases*, Vol. 22 Tursz, T. et al. (eds.). pp. 51–56.
- Epstein, M.A., Achong, B.G. & Barr, Y.M. (1964). *Lancet*, **702**–703.
- Gu, W., Cechova, K., Tassi, V. & Dalla-Favera, R. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 2935–2939.
- Hammerschmidt, W. & Sugden, B. (1989). *Nature*, **340**, 392–397.

- Hunter, T. (1991). *Cell*, **65**, 249–270.
- Joab, I., Triki, H., de Saint Martin, J., Perricaudet, M. & Nicolas, J.C. (1991). *J. Infect. Dis.*, **163**, 53–56.
- Karomilas, A.E., Roy, S., Barber, G.N., Katze, M.G. & Sonenberg, N. (1992). *Science*, **257**, 1685–1689.
- Kato, G.J., Lee, W.M.F., Chen, L. & Dang, C.V. (1992). *Genes & Dev.*, **6**, 81–92.
- Kaye, K., Izumi, K.M. & Kieff, E. (1993). *PNAS*, **90**, 9150–9154.
- Kenney, S., Kamine, J., Holley-Guthrie, E., Mar, E.C., Lin, J.C., Markovitz, D. & Pagano, J. (1989). *J. Virol.*, **63**, 3870–3877.
- Kieff, E. & Liebowitz, D. (1990). *Virology*, Field, B.N., Knipe, D.M. and others (eds.). Raven Press: New York, pp. 1889–1920.
- Land, H., Parada, L.F. & Weinberg, R.A. (1983). *Nature*, **304**, 596–602.
- Lazaris-Karatzas, A., Montine, K.S. & Sonenberg, N. (1990). *Nature*, **345**, 544–547.
- Lugo, T.G., Pendergast, A.-M., Muller, A.J. & Witte, O.N. (1990). *Science*, **247**, 1079–1082.
- Magrath, I. (1990). *Adv. Cancer Res.*, **55**, 133–269.
- Manet, E., Gruffat, H., Trescol-Biemont, M.C., Moreno, N., Chambard, P., Giot, J.F. & Sergeant, A. (1989). *EMBO J.*, **8**, 1819–1826.
- Marcu, K.B., Bossone, S.B. & Patel, A.J. (1992). *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 808–860.
- McLauchlan, J., Phelan, A., Loney, C., Sandri-Goldin, R.M. & Clements, J.B. (1992). *J. Virol.*, **66**, 6939–6945.
- Mikaelian, I., Drouet, E., Marechal, V., Denoyel, G., Nicolas, J.C. & Sergeant, A. (1993). *J. Virol.*, **67**, 734–742.
- Miller, G. (1990). *Virology*, Fields, B.N.e.a. (eds.). pp. 1921–1958.
- Mukherjee, B., Morgenbesser, S.D. & DePinto, R.A. (1992). *Genes & Dev.*, **6**, 1480–1492.
- Pallesen, G., S.J., H.-D., Rowe, M., Lisse, I., Ralfkiaer, E., Sandrejev, E. & Young, L.S. (1991a). *J. Pathol.*, **165**, 289–299.
- Pallesen, G., S.J., H.-D., Rowe, M. & Young, L.S. (1991b). *Lancet*, **337**, 320–322.
- Pallesen, G., Sandvej, K., Hamilton-Dutoit, S.J., Rowe, M. & Young, L.S. (1991c). *Blood*, **78**, 1162–1165.
- Phelan, A., Carmo-Fonseca, M., McLauchlan, J., Loney, C., A.I. & Clements, J.B. (1993). *PNAS*, **90**, 9056–9060.
- Prendergast, G.C., Lawe, D. & Ziff, E.B. (1991). *Cell*, **65**, 395–407.
- Sandri-Goldin, R.M. & Mendoza, G.E. (1992). *Cell*, **68**, 848–863.
- Sawyers, C.L., Callahan, W. & Witte, O.N. (1992). *Cell*, **69**, 901–910.
- Shic, C. & Weinberg, R.A. (1982). *Cell*, **29**, 161–166.
- Sklar, M.D., Thompson, E., Welsh, M.J., Liebermann, J., Grossman, H.B., Smith, M. & Prochownik, E.V. (1991). *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 3699–3710.
- Su, I.J., Hsieh, H.C., Lin, K.H., Uen, W.C., Kuo, C.L., Chen, C.L., Cheng, A.L., Kadin, M.E. & Chen, C.C. (1991). *Blood*, **77**, 799–808.
- Tatsuka, M., Mitsui, H., Wada, M., Nagata, A., Nojima, H. & Okayama, H. (1992). *Nature*, **359**, 333–336.
- Tomkinson, B., Robertson, E. & Kieff, E. (1993). *J. Virol.*, **67**, 2014–2025.
- Wang, D., Liebowitz, D. & Kieff, E. (1985). *Cell*, **40**, 840.
- Wei, C. & Ooka, T. (1989). *EMBO J.*, **8**, 2897–2903.
- Wigler, M., Pellicier, A., Silverstone, S. & Axel, R. (1985). *Cell*, **40**, 725–731.
- Wong, K.-M. & Levine, A.J. (1989). *Virology*, **168**, 11–16.
- Young, L., Alfieri, C., Hennessy, K., Evans, H., O'Hara, M., Anderson, K.C., Ritz, J., Shapiro, R.S., Rickinson, A.B., Kieff, E. & Cohen, J.I. (1989). *N. Engl. J. Med.*, **320**, 1080–1085.
- Zeng, Y., Zhang, I.G., Li, H.Y., Tan, M.G., Zhang, Y.C., Wang, Y.S. & Su, G.R. (1982). *Int. J. Cancer*, **30**, 193–194.

Article 2 : Le Roux & al., 1996



Epstein–Barr virus (EBV) EB1/Zta protein provided in *trans* and competent for the activation of productive cycle genes does not activate the BZLF1 gene in the EBV genome

Frédérique Le Roux, Alain Sergeant and Laura Corbo*

Unité de virologie humaine, ENS-INSERM, U412, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 Allée d'Italie, 69364-Lyon Cedex 07, France

The Epstein–Barr Virus (EBV) gene BZLF1 encodes the transcription factor EB1 (also known as Zta) which is essential for the switch from latency to the lytic cycle: EB1 expressed from a plasmid transfected into B cell lines carrying latent EBV episomes, induces a productive viral cycle. Furthermore, EB1-specific DNA-binding sequences (ZREs) have been found in the promoters of many EBV early genes, including the BZLF1 promoter PZ and the PR promoter. At promoter PR, bicistronic mRNAs are initiated which contain, from 5' to 3', the BRLF1 and the BZLF1 open reading frames (ORFs) encoding respectively the R and EB1 proteins. The current model for the activation of the EBV lytic cycle implies that downregulation of the PZ promoter activity is a key element for latency and that a limiting step in the

activation of the productive cycle is the translation of EB1. Once made, EB1 autoactivates promoter PZ, activates the PR promoter at which an mRNA coding for the EBV transcription factor R is initiated and activates the EBV early genes and the ORI_{lyt}, due to unrestricted accessibility of the EB1-responsive elements in the viral genome. We show here that EB1 expressed from a plasmid activated most if not all of the EBV early genes in the viral genome but not its own gene, BZLF1. Moreover, transfected EB1 induced the transcription of the bicistronic mRNAs from which R is efficiently translated but not EB1. Our results demonstrate that EB1 provided in *trans*, although competent to activate the productive cycle genes, was not sufficient to overcome the downregulation of the PZ promoter.

Introduction

The Epstein–Barr virus (EBV) is a ubiquitous human herpesvirus that persists latently for the lifetime of the infected host. The persistence of EBV and the fact that EBV-infected B lymphocytes from the peripheral blood can proliferate continuously when cultured *in vitro* (immortalization) are believed to be predisposing factors for the emergence of EBV-associated human malignancies such as Burkitt's lymphoma (BL), nasopharyngeal carcinoma (NPC), Hodgkin's disease (HD) and B and T cell lymphomas in immunocompromised individuals (Liebowitz & Kieff, 1993). Little is known about EBV persistence *in vivo*, and the only models for EBV latency are B cells immortalized *in vitro* or Burkitt's lymphoma cell lines.

Various chemical agents, including the tumour promoter 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA), can cause the virus to switch from a latent to a lytic

replication cycle *in vitro* (zur Hausen *et al.*, 1978). The activation seems to be linked to the expression of two EBV-encoded transcription factors: the BZLF1-encoded factor EB1 (also called Z, Zta or ZEBRA; (Chevallier-Gréco *et al.*, 1986; Takada *et al.*, 1986; Countryman *et al.*, 1989; Farrell *et al.*, 1989) and the BRLF1-encoded factor, called R (or Rta) (Hardwick *et al.*, 1988) (Fig. 1).

The current model for the reactivation of EBV in latently infected B cells growing in culture is the following. In such cells, the BZLF1 and BRLF1 genes (Fig. 1) are not detectably transcribed. Activation of the lytic cycle by an initial physiological stimulus is signalled by EB1 being translated from a 1 kb monocistronic mRNA initiated at promoter PZ and/or from 3.0 and 4.0 kb bicistronic mRNAs initiated at promoter PR and containing both the BZLF1 ORF and the BRLF1 ORF from which R is translated (Manet *et al.*, 1989) (Fig. 1). A weak transcription of PZ and PR promoters is induced by TPA in the absence of *de novo* protein synthesis and probably requires the post-transcriptional activation of pre-existing cellular factors (Laux *et al.*, 1988). Interestingly, promoter PZ contains a TRE (TPA responsive element) (Urier *et al.*, 1989; Flemington &

* Author for correspondence. Fax +33 72 72 86 86.
e-mail LauraCorbo@cri.ens-lyon.fr

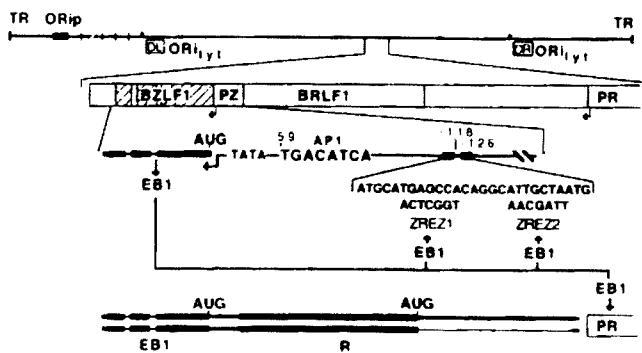


Fig. 1. Schematic representation of the EBV genome and of BZLF1 and BRLF1 genes. The EBV genomic region containing the BZLF1 and BRLF1 genes has been enlarged. The BZLF1 gene is transcribed either as a monocistronic mRNA (1.0 kb) initiated at promoter PZ, or as a bicistronic mRNA (3.0 and 4.0 kb) initiated at promoter PR from which R is translated. In promoter PZ the AP-1 site and the two EB1-responsive elements (ZREZ1 and ZREZ2) are shown. TR: Terminal Repeats; ORIp, plasmid origin of replication; ORI_{lyt}, lytic origin of replication; DR and DL: early promoters overlapping with the ORI_{lyt}. In the schematic representation of the mRNAs initiated at promoter PR, thick lines represent ORFs, thin lines intron sequences and medium thick lines non-coding sequences.

Speck, 1990a), which binds dimeric AP-1 factors that are subject to post-transcriptional regulation induced by TPA (Fig. 1) (Angel *et al.*, 1987, 1988). However, efficient transcription from promoters PZ and PR seems to be due to their activation by EB1. Indeed, promoter PZ contains two EB1-binding sites called here ZREZ1 and ZREZ2 (Fig. 1) and transient expression assays confirmed that EB1 autoactivates its own expression through these ZREZs (Urier *et al.*, 1989; Flemington & Speck, 1990b). Promoter PR is also activated by EB1 through two ZREs in transient expression assays (Fig. 1) (Sinclair *et al.*, 1991).

The model described above suggests that down-regulation of the PZ promoter activity is a key element for latency and that a limiting step in the activation of the lytic cycle is the translation of EB1. Once made, EB1 activates its own expression from promoters PZ and PR (Urier *et al.*, 1989; Flemington & Speck, 1990b; Sinclair *et al.*, 1991) and activates the EBV early genes (Buisson *et al.*, 1989; Chavrier *et al.*, 1989; Chevallier-Gréco *et al.*, 1989; Farrell *et al.*, 1989; Kenney *et al.*, 1989; Lieberman *et al.*, 1989) and the ORI_{lyt} (Cho & Tran, 1993; Schepers *et al.*, 1993; Fixman *et al.*, 1995) due to unrestricted accessibility of the EB1-responsive elements in the viral genome. Accordingly, transfection of an EB1 expression plasmid in latently EBV-infected B cells, is followed by activation of all the EBV early genes including the BRLF1 gene (Chevallier-Gréco *et al.*, 1986; Countryman *et al.*, 1989) and by a productive lytic cycle (Rooney *et al.*, 1989). These observations confirmed that most if not all the ZREs in the viral genome are accessible to

transfected EB1. However, it has not been directly demonstrated that transfected EB1 can alleviate the downregulation of promoter PZ in the viral genome and that EB1 and R are translated from the bicistronic mRNAs initiated at promoter PR in the viral genome. In this study, we have directly evaluated these two points.

Our results show that although transfected EB1 can activate most, if not all, of the EBV early genes in the viral genome, it does not detectably activate transcription from promoter PZ. Moreover, in experimental conditions where transfected EB1 induces the transcription of the bicistronic mRNAs from which R is efficiently translated, neither the BZLF1 1 kb mRNA nor the EB1 protein were detectably expressed from the viral genome. The lack of autoactivation was also seen when promoter PZ was carried by a plasmid and transfected into EBV-positive B cells.

Methods

Cell lines. Akata and Raji cells (EBV-positive Burkitt's lymphoma cell lines) were maintained in RPMI 1640 supplemented with penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 µg/ml) and 10% heat-inactivated fetal calf serum at 37 °C.

Chemical stimulation. Exponentially growing cells were treated with 20 ng/ml TPA (Sigma) and/or 3 mM-butyrate (Sigma), or were treated with anti-human IgG (Sigma) at a final concentration of 0.1 mg/ml.

Plasmids

(i) **Expression vectors.** The expression vectors for EB1 (pAAC-EB1) and for EB1^{scn4} (pAAC-EB1^{scn4}) have been described elsewhere (Giot *et al.*, 1991; Mikaelian *et al.*, 1993). Plasmid pAAC contains the cytomegalovirus (CMV) promoter and the SV40 early polyadenylation signal. The expression plasmids for Jun and Fos contain the human *c-jun* and *c-fos* cDNAs cloned in pSG5 vector (Stratagene) (a gift from I. Crenon, B. I. P., Marseille, France).

(ii) **Reporter gene.** Construction of the plasmid containing the pZ-CAT reporter gene (pZ225) has been described elsewhere (Urier *et al.*, 1989).

Transfections. Plasmid DNA was purified through two sequential caesium chloride gradients. One day before transfection, lymphoid E cells were resuspended at a density of 0.5×10^6 cells/ml in fresh medium. Transfections were performed by electroporation using 10–100 µg of DNA and 5 to 10×10^6 cells depending on the experiments. Cells were shocked at 220 V, at 960 µF with a Zappe electroporation unit (Bio-Rad) and then incubated in fresh medium with 10% FCS at the concentration of 0.5×10^6 cells/ml.

CAT assays. CAT assays were performed essentially as described previously (Gorman *et al.*, 1982). Sonication of the cells, however, was replaced by lysis in a buffer containing 0.25 M-Tris-HCl pH 8.0 and 0.05% SDS.

Immunoblots. Cells (5×10^6) were washed three times with cold PB solution and incubated with 100 µl of lysis buffer as already describe (Mikaelian *et al.*, 1993). As measured by Bradford assay, equal amounts of protein were loaded and separated on a 10% polyacrylamide-SDS gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell) by electroblotting. The efficiency of the transfer was assayed by Ponceau Red staining then the membrane was incubate

with the primary antibody. Four antibodies were used: the monoclonal antibody mAbZ125 detects both EB1 and EB1^{GCN4} proteins, the monoclonal antibody mAb8C12 detects R; the rabbit polyclonal antibody to bacterially synthesized EB1 Leucine Zipper AbLZ^{EB1} detects only EB1; and the rabbit polyclonal antibody to bacterially synthesized EB2 AbEB2 detects the BMLF1 protein EB2 (also called Mta). The membranes were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse (for mAbZ125 and mAb8512 antibodies) or goat anti-rabbit (for AbLZ^{EB1} and AbEB2) immunoglobulins (Amersham). The proteins were visualized by means of the enhanced chemiluminescence kit (Amersham) as instructed by the supplier.

RNA extraction, poly(A)⁺ isolation and Northern blotting. Total RNA was extracted by denaturation in guanidium isothiocyanate followed by pelleting through a CsCl cushion (Ghisin *et al.*, 1974). Poly(A)⁺ RNA was isolated by using oligo(dT) dynabeads (Dynal) as instructed by the supplier. Poly(A)⁺ RNAs were then size fractionated by electrophoresis in formaldehyde agarose gels and transferred onto nylon membrane (Hybond N; Amersham). The immobilized RNAs were hybridized for 18 h at 42 °C with labelled DNA fragments in 50% formamide, 1% SDS, 10% dextran sulphate, 1 M-NaCl, 150 µg/ml herring sperm DNA and 100 µg/ml yeast tRNA. The filters were washed twice with 2 × SSPE at room temperature, twice with 2 × SSPE/0.1% SDS at 65 °C, once with 0.5 × SSPE/0.1% SDS at 65 °C.

Preparation and labelling of probe DNA. The DNA probe R (see Fig. 4a) was purified after digestion of the plasmid pSPT-R (Gruffat *et al.*, 1990) by *Xba*I/*Eco*RI and labelled using a multiprime DNA-labelling kit (Appligene). The DNA probes LZ-EB1 and DBD-EB1 (see Fig. 4) were prepared as follows: 10 ng of the pAAC-EB1 *Eco*RI/*Pst*I (LZ-EB1) and *Pst*I/*Nhe*I (DBD-EB1) purified DNA fragments were labelled by asymmetric PCR in a 100 µl reaction containing 50 mM-Tris HCl (pH 8.3), 150 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM dATP, dGTP, dTTP and 50 µCi of [α -³²P]dCTP (300 µCi/mmol), 1 µM-primer and 2 U *Taq* polymerase. Forty cycles of PCR were performed using the following temperature profile: 94 °C, 30 s; 50 °C, 30 s; 72 °C, 2 min. The sequences of the oligonucleotides used for the amplification were: primer LZ-EB1: 5' CGACAGGAAGATATT 3', primer DBD-EB1: 5' GGGTAATGGCATCCGTGACCTCC 3'.

Results

Several reports have convincingly demonstrated that EB1 expressed from a plasmid transfected into B cell lines carrying latent EBV episomes activates transcription of the early mRNAs from the viral genome, including the bicistronic mRNAs expressed from promoter PR (Fig. 1) and the lytic cycle (Countryman *et al.*, 1989; Rooney *et al.*, 1989). However it has not been directly demonstrated that transfected EB1 could activate transcription from the PZ promoter in the viral genome. To clarify this point, we have constructed an EB1^{GCN4} hybrid protein, in which the dimerization domain of EB1 has been replaced by the dimerization domain of the yeast transcription factor GCN4 (Fig. 2a). Such a hybrid protein can be differentiated from the EB1 protein translated from mRNAs transcribed from the viral genome by the use of two antibodies, mAbZ125 and AbLZ^{EB1} (Fig. 2a and Methods).

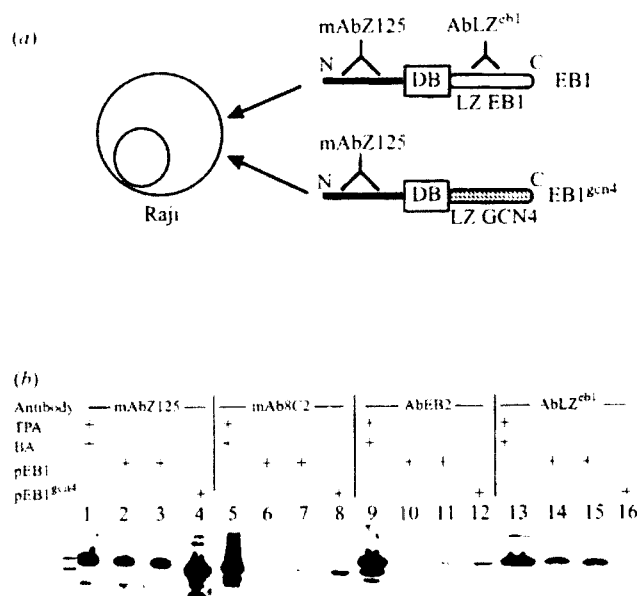


Fig. 2. The EB1 and EB1^{GCN4} proteins are functionally equivalent when transfected in Raji cells. (a) Schematic structure of the EB1 protein and EB1^{GCN4} chimeras. Key: DB, DNA-binding domain, LZ, leucine zipper. (b) Induction of EBV early genes by EB1 and EB1^{GCN4} transfected in Raji cells. Raji cells (1×10^7) were transfected by electroporation with either 100 µg of pAAC-EB1 (pEB1, lanes 2, 3, 6, 7, 10, 11, 14 and 15) or 100 µg of pAAC-EB1^{GCN4} (pEB1^{GCN4}, lanes 4, 8, 12 and 16) or treated with TPA/BA (lanes 1, 5, 9 and 13). Proteins were detected using antibody as indicated in the upper part of the panel.

EB1 and EB1^{GCN4} expressed from a transfected plasmid activate the expression of early genes in the EBV viral genome

In order to compare functionally the EB1 protein and the hybrid protein EB1^{GCN4}, their relative stability and transcriptional potential were evaluated following transient expression in Raji cells. Upon transfection of the expression vector pAAC-EB1^{GCN4}, the EB1^{GCN4} protein was detected using mAbZ125 (Fig. 2b, lane 4) and migrated with an apparent molecular mass lower than that of the EB1 protein expressed after transfection of Raji cells with the expression vector pAAC-EB1 (Fig. 2b, lanes 2 and 3), or induced from the viral genome in Raji cells treated by TPA plus butyrate (TPA/BA) (Fig. 2b, lane 1). Comparable amounts of EB1 and EB1^{GCN4} proteins accumulated, suggesting a similar stability (Fig. 2b, compare lanes 2 and 3 to lane 4). As expected, the antibody AbLZ^{EB1} detected the EB1 proteins expressed from pAAC-EB1 (Fig. 2b, lanes 14 and 15), and induced by TPA/BA from the viral genome (Fig. 2b, lane 13), but did not detect the EB1^{GCN4} protein (Fig. 2b, lane 16). The transfected EB1 and EB1^{GCN4} proteins both induced expression of the EBV early antigens which were detected using a human antibody (not shown). Both proteins also induced expression of the EBV early protein R (Fig. 2b,

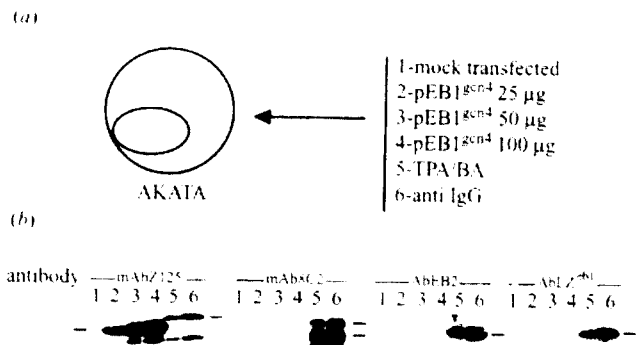


Fig. 3. Induction of EBV early proteins in Akata cells transfected with pAAC-EB1^{gcn4} or treated with TPA/BA or with anti-IgG. (a) Akata cells were mock-transfected or transfected with the indicated quantities of pAAC-EB1^{gcn4} (pEB1^{gcn4}) or treated for 48 h with TPA/BA or for 12 h with anti-IgG. (b) Visualization of the EBV early protein EB1 (AbLZ^{EB1}), R (mAb8C2) and EB2 (AbEB2) expressed in Akata cells transfected with increasing quantities of pAAC-EB1 (lanes 2–4) or treated with TPA/BA (lane 5) or with anti-IgG (lane 6). mAbZ125 was used to visualize the EB1^{gcn4} proteins expressed from transfected plasmid pAAC-EB1^{gcn4}.

lanes 5 to 8) and of the BMLF1-encoded EBV early protein EB2 (Fig. 2*b*, lanes 9 to 12). These results demonstrate that when transiently expressed in Raji cells, EB1^{gcn4} and EB1 were functionally equivalent and activated the transcription of EBV early genes including transcription from the promoter controlling the expression of the bicistronic mRNAs from which R is translated.

EB1^{gcn4} expressed from a transfected plasmid does not activate the expression of EB1 from the viral genome

Surprisingly, in Raji cells transfected with pAAC-EB1^{gcn4}, no EB1 protein expressed from the viral genome could be detected using AbLZ^{EB1} (Fig. 2*b*, lane 16). However, it must be emphasized that the amounts of R (Fig. 2*b*, lanes 6, 7 and 8) and EB2 (Fig. 2*b*, lanes 10, 11 and 12) proteins induced by transfected EB1 and EB1^{gcn4} were very low compared to the level of these proteins induced by TPA/BA (Fig. 2*b*, lanes 5 and 9). Transfected EB1^{gcn4} might therefore, have induced the expression of EB1 from the viral genome, but in amounts undetectable by our methods. In order to rule out that this observation was specific to Raji cells, the EB1^{gcn4} expression plasmid was transfected in increasing amounts in Akata cells. As shown in Fig. 3(*b*), in Akata cells transfected with plasmid pAAC-EB1^{gcn4}, the EB1^{gcn4} protein was expressed (mAbZ125, lanes 2 to 4) and migrated slightly faster than the EB1 protein induced from the viral genome by TPA/BA (mAbZ125, lane 5) or anti-IgG (mAbZ125, lane 6). The amount of EB1^{gcn4} protein expressed increased with the amount of expression plasmid transfected (Fig. 3*b*, mAbZ125, lanes 2 to 4).

However, transfected EB1^{gcn4} again inefficiently induced the R (Fig. 3*b*, mAb8C2, lanes 2 to 4) and EB2 proteins (Fig. 3*b*, lanes 2 to 4) from the viral genome and did not detectably induce EB1 protein from the viral genome (Fig. 3*b*, AbLZ^{EB1}, lanes 2 to 4). Moreover, the increase in the amount of EB1^{gcn4} protein expressed was not followed by an increase in the amount of R and EB2 proteins induced (Fig. 3*b*, mAb8C2 and AbEB2, lanes 2, 3 and 4), the maximum induction level being obtained after transfection of 25 µg of plasmid pAAC-EB1^{gcn4} (lane 2).

In conclusion, these results suggest that transfected EB1^{gcn4} could not induce transcription from the PZ promoter of the 1 kb mRNA carrying the BZLF1 ORF, and that only R was detectably translated from the bicistronic mRNAs carrying both the BZLF1 and the BRLF1 ORFs.

Promoter PZ in the Raji viral genome is not detectably activated by transfected EB1^{gcn4}

To rule out the possibility that the 1 kb mRNA initiated at promoter PZ (see Fig. 1) was induced by EB1^{gcn4} in Raji cells but was not detectably translated, we used Northern blotting to analyse the mRNAs transcribed from the BZLF1/BRLF1 region in Raji cells treated by TPA/BA or transfected with the expression vector pAAC-EB1^{gcn4}. Three ³²P-labelled DNA fragments were hybridized to the Northern blots (Fig. 4*a*). Probe LZ-EB1 covers only the third exon of BZLF1, corresponding to the EB1 dimerization domain, and is therefore specific for the mRNAs transcribed from promoters PZ and PR in the viral genome (Fig. 4*a*). Probe DBD-EB1 covers the BZLF1 second exon and should detect EB1^{gcn4} mRNA expressed from the transfected plasmid, the 1 kb mRNA and the bicistronic mRNAs transcribed from the viral genome (Fig. 4*a*). Probe R covers the BRLF1 ORF and should only detect the bicistronic mRNAs transcribed from the viral genome (Fig. 4*a*).

As shown in Fig. 4(*b*), two major RNA species, 3.0 kb and 1.0 kb long, were detected with probe DBD-EB1 in the poly(A)⁺ RNAs from Raji cells treated by TPA/BA (lane 2). The 3.0 kb RNA species corresponds to bicistronic mRNAs since it was also detected by the R DNA probe (lane 6) (the 4 kb mRNA species is less abundant). The 1.0 kb RNA species induced by TPA/BA, corresponds to the monocistronic mRNA initiated at promoter PZ, since it was detected by the DBD-EB1 DNA probe (lane 2), by the LZ-EB1 DNA probe (lane 4) but not by the R DNA probe (lane 6).

In Raji cells transfected with plasmid pAAC-EB1^{gcn4}, although a low level of expression of R protein was detected (Fig. 2*b*, mAb8C2, lane 8), the 3.0 kb mRNA species was not detected by the DNA probes DBD-EB1

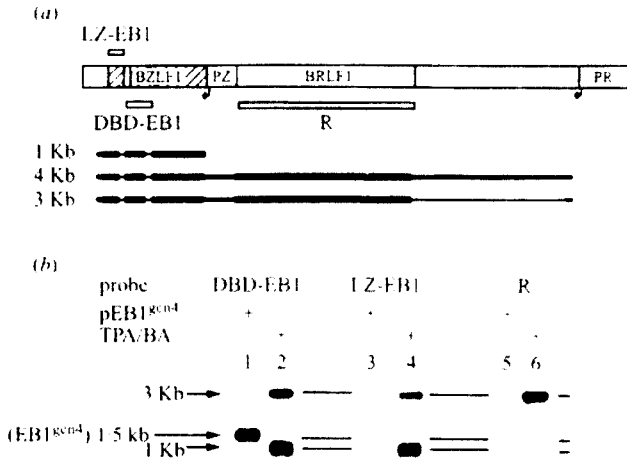


Fig. 4. The mRNA transcribed from the BZLF1/BRLF1 genes in Raji cells treated by TPA/BA or transfected with pAAC-EB1^{gcn4}. (a) Schematic representation of the mRNAs transcribed from BZLF1 and BRLF1 transcription units and position of the DNA probes used for Northern blotting analysis. (b) Northern blotting analysis. Raji cells were electroporated with pAAC-EB1^{gcn4} (10 µg/10⁶ cells, lanes 1, 3 and 5) or treated with TPA/BA (lanes 2, 4 and 6). Poly(A)⁺ RNAs were isolated, size separated and transferred to nitrocellulose as described in Methods. The same membrane was subsequently incubated with the DNA probes indicated in the upper part of the panel. In the left margin, the position and the size in kilobases (kb) of the different transcripts are indicated by arrows.

(Fig. 4b, lane 1), LZ-EB1 (Fig. 4b, lane 3) or R (Fig. 4b, lane 5). Similarly, the 1.0 kb mRNA species initiated at promoter PZ was also not detectable in Raji cells transfected by pAAC-EB1^{gcn4} (Fig. 4b, lanes 1 and 3), although the 1.5 kb EB1^{gcn4} mRNA was clearly detected by the DNA probe DBD-EB1 (Fig. 4b, lane 1).

Butyrate-increased expression of transfected EB1^{gcn4} is followed by increased expression of EB1 and R from the viral genome

The transfected EB1^{gcn4} protein, when expressed in Raji cells, induced only very inefficiently the expression of the EBV early proteins R (Fig. 2b, mAb8C2) and EB2 (Fig. 2b, AbEB2), whereas the expression of the early protein EB1 was not detectable (Fig. 2b, AbLZ^{eb1}). This was also seen at the level of the transcripts initiated at promoter PZ and PR in the viral genome (Fig. 4b). Since butyrate potentiates the activation of the EBV early gene expression by TPA (Ito *et al.*, 1981), we reasoned that butyrate might also potentiate the effect of transfected EB1^{gcn4}.

As shown in Fig. 5(b), treatment of Raji cells with butyrate was not followed by a detectable expression of R (mAb8C2, lane 2) or EB2 (AbEB2, lane 2). In Raji

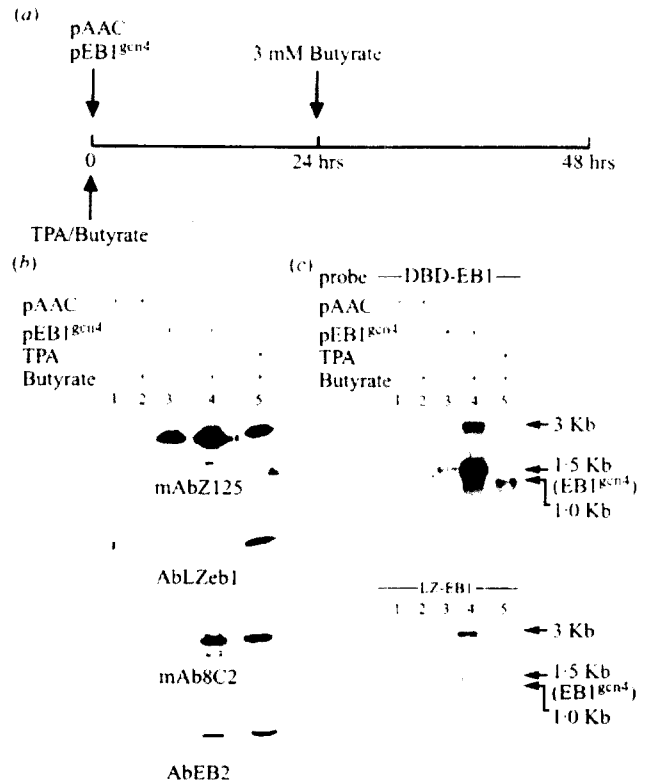


Fig. 5. Butyrate-increased expression of transfected EB1^{gcn4} increases the expression of EB1, R and EB2 from the Raji viral genome. (a) Raji cells were either treated by TPA plus butyrate, or mock-transfected (pAAC, 10 µg/10⁶ cells) or transfected with pAAC-EB1^{gcn4} (pEB1^{gcn4}, 10 µg/10⁶ cells). Western blot (b) and Northern blot (c) analysis of proteins and poly(A)⁺ RNAs isolated from Raji cells treated as indicated in the upper part of the panel. The antibodies used for the immunodetection are indicated at the left of (b); the position and the size of the mRNAs detected by DBD-EB1 and LZ-EB1 probes are indicated by arrows on the right-hand side of (c).

cells transfected with pAAC-EB1^{gcn4}, EB1^{gcn4} (mAbZ125, lane 3) was expressed but only the induction of R from the viral genome was weakly detectable (mAb8C2, lane 3). Butyrate increased the amount of EB1^{gcn4} protein expressed from plasmid pAAC-EB1^{gcn4} (mAbZ125, compare lane 3 to lane 4) and efficient expression from the viral genome of both R (mAb8C2, lane 4) and EB2 (AbEB2, lane 4) proteins was also observed, their expression was as efficient as that observed in Raji cells treated with TPA/BA (mAb8C2 and AbEB2, lanes 5). Moreover, in Raji cells transfected with plasmid pAAC-EB1^{gcn4} and treated with butyrate, the EB1 protein was now expressed from the viral genome (AbLZ^{eb1}, lane 4), although in very low amounts compared to R and EB2 (mAb8C2 and AbEB2, lanes 4). Thus, it would appear that EB1^{gcn4} plus butyrate induced, although very inefficiently, the expression of viral mRNAs from which EB1 could be translated. To characterize these mRNAs, we analysed by Northern

blotting the poly(A)⁺ RNAs transcribed from the BZLF1/BRLF1 region in Raji cells transfected with the expression vector pAAC-EB1^{scn4} and treated or not with butyrate.

As shown in Fig. 5(c), for the poly(A)⁺ RNAs isolated from Raji cells transfected with plasmid pAAC-EB1^{scn4}, the ³²P-labelled DBD-EB1 probe hybridized to a 1.5 kb RNA species corresponding to the EB1^{scn4} mRNA (upper panel, lane 3), but did not detect the 1 kb RNA species found in the poly(A)⁺ RNAs isolated from Raji cells induced by TPA/BA (upper panel, lane 5). Moreover, although the R protein was detectably induced by transfected EB1^{scn4} (Fig. 5b, mAb8C2, lane 3), no 3.0 kb RNA could be detected (Fig. 5c, upper panel, lane 3). However, when pAAC-EB1^{scn4}-transfected Raji cells were treated with butyrate, more 1.5 kb mRNA was expressed from the plasmid (Fig. 5c, upper panel, lane 4), corresponding to the increased expression of EB1^{scn4} protein (Fig. 5b, mAbZ125, lane 4). The 3.0 kb mRNA was now detectable and abundant, but no 1 kb mRNA expressed from promoter PZ could be detected (Fig. 5c, upper panel, lane 4), despite a clear but weak expression of EB1 protein from the viral genome (Fig. 5b, AbLZ^{eb1}, lane 4). To ascertain that the 1.0 kb transcript was not detectably transcribed from the PZ promoter, we used as a probe the ³²P-labelled DNA fragment LZ-EB1 which should not hybridize to the EB1^{scn4} 1.5 kb mRNAs expressed from the transfected plasmid. As shown in Fig. 5(c), lower panel, lane 4, a weak hybridization with the EB1^{scn4} 1.5 kb transcript was observed probably due to the large amount of 1.5 kb mRNA. However and more importantly, the bicistronic mRNA was strongly detected but again no 1 kb mRNA could be seen (Fig. 5c, lower panel, lane 4). In conclusion, the PZ promoter, when compared to the PR promoter, is very poorly, if at all, activated by EB1^{scn4} in Raji cells. Moreover, in conditions where efficient expression of the 3.0 kb mRNA is detected (Fig. 5c, lane 4, upper and lower panels) and efficient translation of R from these mRNAs is observed (Fig. 5b, mAb8C2, lane 4), very little EB1 protein is detected (Fig. 5b, AbLZ^{eb1}, lane 4) demonstrating that the BZLF1 ORF is poorly translated from the bicistronic mRNAs.

Promoter PZ transfected in Raji cells is also not activated by EB1

It is difficult to formally conclude that promoter PZ is not activated by EB1^{scn4} in the viral genome, since a very small amount of EB1 protein was found in Raji cells transfected with pAAC-EB1^{scn4} and treated with butyrate. However, showing that the promoter PZ transfected on a plasmid in Raji cells would also not respond to EB1 or EB1^{scn4}, would reinforce the idea that it is also

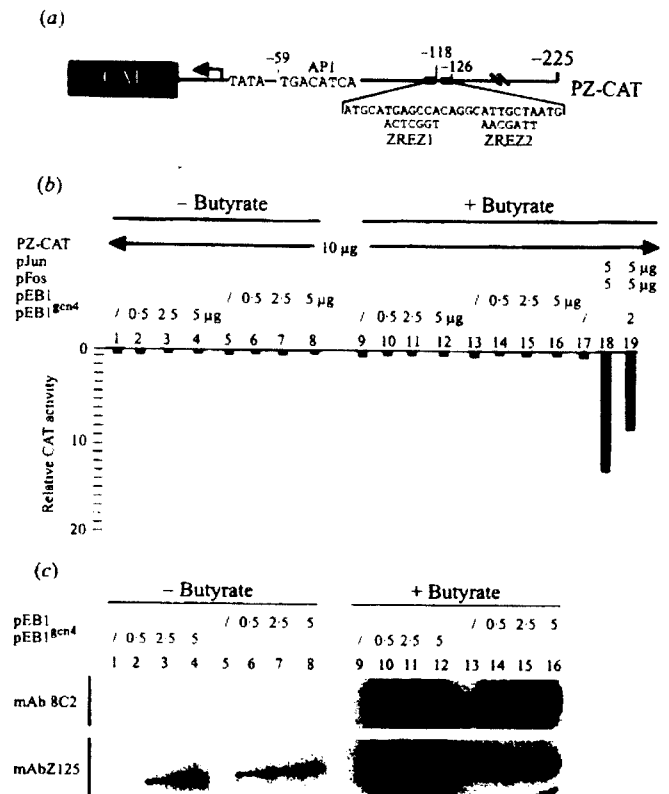


Fig. 6. Promoter PZ carried by a plasmid is not activated in Raji cells transfected by EB1 or EB1^{scn4}. (a) Schematic representation of the PZ-CAT reporter gene construct. Raji cells were electroporated with different plasmids as indicated. Twenty-four h after transfection 3 mM-butyrate was added or not and 24 h later the cells were collected for CAT assays (b), or to analyse EB1 and R expression by western blotting (c) The antibodies used for the immunodetection are indicated at the left of (c).

not activated in the viral genome. The PZ promoter carrying the two EB1 binding sites and the AP-1 site was cloned upstream of the CAT gene in plasmid PZ-CAT (Fig. 6a) (Uriet *et al.*, 1989). Upon transfection in Raji cells, PZ-CAT had a weak basal activity (Fig. 6b, lanes 1 and 5), which was not increased by treatment of the cells with 3 mM-butyrate (Fig. 6b, lanes 9 and 13). Neither EB1^{scn4} (Fig. 6b, lanes 2 to 4), nor EB1 (Fig. 6b, lanes 6 to 8) increased the PZ-CAT basal activity, although EB1^{scn4} (Fig. 6c, lanes 2 to 4) and EB1 (Fig. 6c, lanes 6 to 8) proteins were detectably expressed. Moreover, PZ-CAT activity was also not influenced by EB1^{scn4} (Fig. 6b, lanes 10 to 12) nor by EB1 (Fig. 6b, lanes 14 to 16) in the presence of 3 mM-butyrate, although butyrate dramatically increased the amount of EB1^{scn4} (Fig. 6c, mAbZ125, lanes 10 to 12) or of EB1 proteins (Fig. 6c, mAbZ125, lanes 14 to 16) expressed from the transfected plasmids. The transfected EB1^{scn4} and EB1 proteins were functionally active since both induced the expression of the R protein from the Raji viral genome (Fig. 6c, mAb8C12, lanes 10 to 12 and 14 to 16).

As a further control for functionality, Raji cells were treated with butyrate and cotransfected with PZ-CAT together with Jun plus Fos, or Jun plus Fos plus EB1^{scn4} expressed from appropriate expression vectors. The basal activity of PZ-CAT (Fig. 6*b*, lane 17) was activated by Jun plus Fos (Fig. 6*b*, lane 18), but the Jun/Fos activated transcription of PZ-CAT was not further affected by EB1^{scn4} (Fig. 6*b*, lane 19). Thus, the PZ promoter was potentially functional, and overexpression of EB1^{scn4} did not prevent its activation by Jun and Fos. In conclusion, the PZ promoter was not activated by EB1 in Raji cells both in the viral genome and when carried on a plasmid.

Discussion

In the current model for the activation of the EBV lytic cycle genes (Fig. 1), one limiting step is the translation of EB1 and the autoactivation of promoter PZ. Once made, EB1 will bind to EB1-responsive elements in the viral genome and activate transcription. If this is true, then transfection of an EB1 expression plasmid in EBV-positive B cells should result in the transcription of all the EBV early genes including transcription from the PZ and PR promoters. The results presented in this report demonstrate that upon transfection in Raji cells of plasmids from which EB1 or EB1^{scn4} was expressed, transcription from many (if not all) EBV early promoters was induced in the viral genome, but not from the PZ promoter. These results suggest that the expression of an EB1 protein competent for lytic cycle activation in B cells latently infected with EBV was not sufficient to overcome the downregulation of promoter PZ. This downregulation could be due to a repressor, to a lack of competent cellular factors or both. Interestingly, negatively *cis*-acting elements have been identified in the PZ promoter (Schwarzmann *et al.*, 1994; Montalvo *et al.*, 1995). Moreover, the cellular repressor YY1 has been shown to bind *in vitro* to two elements in the PZ promoter and a loss of YY1 binding-activity was observed after TPA treatment (Montalvo *et al.*, 1995). Whether these negatively *cis*-acting elements are occupied by factors in the viral genome in the presence of EB1 has not yet been evaluated. Moreover, in PZ-CAT, the minimum PZ promoter devoid of all negatively *cis*-acting elements except for that located next to the AP-1 site, responded to Jun and Fos but did not respond to EB1. These results strongly suggest that the lack of EB1-responsiveness of promoter PZ is not directly linked to the presence of repressors. Viral latency has been proposed to be maintained via antisense hybridization of EBNA1 and EB1 hnRNAs (Prang *et al.*, 1995), via the direct interaction of EB1 with NF- κ B p65 (Gutsch *et al.*, 1994), the retinoic acid receptor (Sista *et al.*, 1993, 1995)

or p53 (Zhang *et al.*, 1994) leading to inactivation of the EB1 transactivating function. Our results clearly show that the function of transfected EB1 is not inhibited by any of the factors described above, since transfected EB1 proteins activated many if not all of the EBV early genes in the viral genome. Furthermore, as shown in Fig. 2 (lanes 2 to 4), EB1 and EB1^{scn4} were functionally equivalent as they induced both the BRLF1 and BMLF1 genes from which R and EB2 mRNAs were transcribed. However, these activations were very inefficient when compared to the induction of the BRLF1 and BMLF1 genes in Raji cells treated with TPA and butyrate, even though the amounts of EB1 proteins expressed were almost equivalent in extracts prepared from TPA/BA-treated cells or from Raji cells transiently expressing EB1 or EB1^{scn4} (see Fig. 2*b*). It could be that EB1 induced by TPA is a more competent transcription factor than EB1 expressed from a plasmid, due to post-transcriptional modifications induced by TPA (Daibata *et al.*, 1992; Hunter & Karin, 1992; Kolman *et al.*, 1993). Another possibility is that butyrate-induced chromatin alterations (Klehr *et al.*, 1992) in the viral genome render the BRLF1 and the BMLF1 promoters more accessible to EB1. However, although TPA alone did not affect the transcription of the early genes in Raji cells expressing transfected EB1^{scn4} (data not shown), butyrate dramatically increased the amount of EB1^{scn4} protein expressed from the transfected plasmid and a strong induction from the viral genome of R, EB2 and to a much lower extent EB1, was observed (see Fig. 5*b*). The increased expression of R, EB2 and EB1 from the viral genome was probably due to the large amount of EB1^{scn4} protein translated from butyrate-induced BZLF1 mRNAs initiated at the CMV promoter in plasmid pAAC-EB1^{scn4} (see Fig. 5*c*). It should be noted that the CMV promoter was found to be responsive to butyrate although the herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-tk) promoter was not (not shown). The effect of butyrate is therefore likely to be due to a direct induction of promoter CMV in plasmid pAAC-EB1^{scn4} rather than an effect on the EBV chromatin. Finally, it is possible that EB1 and EB1^{scn4} are not equivalent at activating the PZ promoter. However, this is unlikely. Indeed, the 'authentic' P3HR1 EB1 protein can be clearly separated by SDS-PAGE from EB1 expressed from the Raji genome (Manet *et al.*, 1989). When EB1-P3HR1 was expressed in Raji cells, it activated all the EBV early promoters except the PZ promoter (not shown).

Increased amounts of EB1^{scn4} in transfected Raji cells treated with butyrate strongly induced the mRNAs carrying both the BZLF1 and the BRLF1 ORFs from which R was efficiently translated but not EB1. However, even in these conditions, the 1.0 kb mRNA carrying the BZLF1 ORF and initiated at promoter PZ was

undetectable (Fig. 5c), although some EB1 protein was translated from mRNAs initiated at promoters in the viral genome (Fig. 5b). Thus, it remains to be established whether the EB1 protein expressed from the viral genome is due to an undetectable induction of the PZ promoter or to inefficient translation of the EB1 protein from bicistronic mRNAs. Nevertheless, in conditions where efficient expression of the 3.0 kb mRNA was detected (Fig. 5c, lane 4) and efficient translation of R from this mRNA was observed (Fig. 5b, mA8C2, lane 4), very little EB1 protein was detected (Fig. 5b, AbLZ^{eb1}, lane 4) demonstrating that the BZLF1 ORF was poorly translated from the bicistronic mRNAs.

In conclusion, an EB1 protein overexpressed and competent for transcriptional activation of the EBV transcription units in the viral genome, did not activate the BZLF1 promoter either in the viral genome or carried by a plasmid in EBV-positive cells. It remains to be seen if the lack of autoactivation by transfected EB1 of the PZ promoter in plasmid PZ-CAT and the lack of autoactivation of the PZ promoter in the viral genome are functionally comparable. Furthermore, additional studies are required in order to investigate whether transfected EB1 can access the ZREs in the PZ promoter and, if so, to determine why DNA-bound EB1 cannot autoactivate promoter PZ.

We thank Conrad B. Blum for reading the manuscript. We are grateful to K. Takada (Nihon University School of Medicine, Tokyo, Japan) for providing the Akata cell line and to I. Creton (B.I.P., Marseille, France) for c-Jun and c-Fos expression vectors. This work was supported by INSERM (contract no. 910117 to A.S.), by the Association pour la recherche sur le cancer (contract no. 6810 to A.S.) and by FNCLCC.

References

- ANGEL, P., IMAGAWA, M., CHIU, R., STEIN, B., IMBRA, R. J., RAHMSDORF, H. J., JONAT, C., HERRLICH, P. & KARIN, M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* **49**, 729-739.
- ANGEL, P., HATTORI, K., SMEAL, T. & KARIN, M. (1988). The Jun protooncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP1. *Cell* **55**, 875-885.
- BUISSON, M., MANET, E., BIEMONT, M. C., GRUFFAT, H., DURAND, B. & SERGEANT, A. (1989). The Epstein-Barr virus (EBV) early protein EB2 is a posttranscriptional activator expressed under the control of EBV transcription factors EB1 and R. *Journal of Virology* **63**, 5276-5284.
- CHAVRIER, P., GRUFFAT, H., CHEVALLIER-GRÉCO, A., BUISSON, M. & SERGEANT, A. (1989). The Epstein-Barr virus (EBV) early promoter contains a cis-acting element responsive to the EBV transactivator EB1 and an enhancer with constitutive and inducible activities. *Journal of Virology* **63**, 607-614.
- CHEVALLIER-GRÉCO, A., MANET, E., CHAVRIER, P., MOSNIER, C., DAILLIE, J. & SERGEANT, A. (1986). Both Epstein-Barr virus (EBV) encoded trans-acting factors, EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter. *EMBO Journal* **5**, 3243-3249.
- CHEVALLIER-GRÉCO, A., GRUFFAT, H., MANET, E., CALENDER, A. & SERGEANT, A. (1989). The Epstein-Barr virus (EBV) DR enhancer contains two functionally different domains: domain A and cell specific, domain B is transactivated by the EBV R. *Journal of Virology* **63**, 615-623.
- CHO, M.-S. & TRAN, V.-M. (1993). A concatenated f Barr viral DNA in lymphoblastoid cell lines induced with BZLF1. *Virology* **194**, 838-842.
- COUNTRYMAN, J. K., JENSON, H., GROGAN, E. & MILLI 2-7 kb rearranged DNA fragment from Epstein-Barr disruption of latency. *Cancer Cells* **4**, 517-523.
- DAIBATA, M., HUMPHREYS, R. E. & SAIREN, J. Phosphorylation of the Epstein-Barr virus BZLF1 gene product Zebra. *Virology* **188**, 916-920.
- FARRELL, P. J., ROWE, D. T., ROONEY, C. M. & KOUZAI, J. Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator specific consensus AP-1 site and is related to c-Fos. *EMBO Journal* **12**, 127-132.
- FIXMAN, E. D., HAYWARD, G. S. & HAYWARD, S. L. Regulation of Epstein-Barr virus ori_{EBV}: lack of a de encoded origin-binding protein and dependence on transfection assays. *Journal of Virology* **69**, 2998-3003.
- FLEMINGTON, E. & SPECK, S. H. (1990a). Identification of response elements in the promoter of the Epstein-Barr lytic switch gene BZLF1. *Journal of Virology* **64**, 1227-1232.
- FLEMINGTON, E. & SPECK, S. H. (1990b). Autoregulation of Epstein-Barr virus putative lytic cycle switch gene BZLF1. *Virology* **64**, 1227-1232.
- GIOT, J. F., MIKHAELIAN, I., BUISSON, M., MANET, E., JOU, J. C. & SERGEANT, A. (1991). Transcriptional interference of the EBV transcription factors EB1 and R: both DNA activation domains of EB1 are required. *Nucleic Acids Research* **19**, 1251-1258.
- GLISIN, V., CRKVENJAKOV, R. & BYUS, C. (1974). R1 isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry* **13**, 2633-2639.
- GORMAN, C. M., MOFFAT, L. F. & HOWARD, B. H. (1987). Binant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology* **7**, 1323-1331.
- GRUFFAT, H., MANET, E., RIGOLET, A. & SERGEANT, A. (1989). Enhancer factor R of Epstein-Barr virus (EBV) is a serine DNA binding protein. *Nucleic Acids Research* **17**, 66-71.
- GUTSCH, D. E., HOLLEY-GUTHRIE, E. A., ZHANG, H., BLANAR, M. A., BALDWIN, A. S. & KENNEY, S. C. (1990). The transactivator of Epstein-Barr virus, BZLF1, physically interacts with the p65 subunit of NF- κ B. *Cellular Biology* **14**, 1939-1948.
- HARDWICK, J. M., LIEBERMAN, P. M. & HAYWARD, S. D. Epstein-Barr virus transactivator, R, induces expression of cytoplasmic early antigen. *Journal of Virology* **62**, 22-27.
- HUNTER, T. & KARIN, M. (1992). The regulation of tyrosine phosphorylation. *Cell* **70**, 375-387.
- ITO, Y., KAWANISHI, M., HARAYAMA, T. & TAKABAYA, T. Combined effect of the extracts from *Croton tigli* lathyris or *Euphorbia tirucalli* and n-butyrate on Epstein-Barr virus expression in human lymphoblastoid P3HR-1 and Raji cells. *Letters to Nature* **12**, 175-180.
- KENNEY, S., KAMINE, J., HOLLEY-GUTHRIE, E., LIN, J. C., PAGANO, J. (1989). The Epstein-Barr virus (EBV) BZLF1 early gene product differentially affects latent versus lytic promoters. *Journal of Virology* **63**, 1729-1736.
- KLEHR, D., SCHLAKE, T., MAASS, K. & BODE, J. (1990). Attached regions (SAR elements) mediate transcriptional activation by butyrate. *Biochemistry* **29**, 3223-3229.
- KOLMAN, J. L., TAYLOR, N., MARSHAK, D. R. & MILLER, R. L. Serine-173 of the Epstein-Barr virus ZEBRA protein is a DNA binding site and is a target for casein kinase II phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **86**, 10115-10119.
- LAUX, G., FREESE, U. K., FISCHER, R., POLACK, E., BORNKAMM, G. W. (1988). TPA-inducible Epstein-Barr virus in Raji cells and their regulation. *Virology* **162**, 503-511.
- LIEBERMAN, P. M., HARDWICK, J. M. & HAYWARD, S. D. Responsiveness of the Epstein-Barr virus *NasI* enhancer

- the Z transactivator is mediated in a cell-type-specific manner by two independent signal regions. *Journal of Virology* **63**, 3040–3050.
- LIEBOWITZ, D. & KIEFF, E. (1993). Epstein-Barr virus. In *Virology*, pp. 107–172. Edited by B. N. Fields & D. M. Knipe. New York: Raven Press.
- MANET, E., GRUFFAT, H., TRESOL-BIEMONT, M. C., MORENO, N., CHAMBARD, P., GIOT, J. F. & SERGEANT, A. (1989). Epstein-Barr virus bicistronic mRNA generated by facultative splicing code for two transcriptional trans-activators. *EMBO Journal* **8**, 1819–1826.
- MIKAEIAN, I., DROUET, E., MARECHAL, V., DENOYEL, G., NICOLAS, J. C. & SERGEANT, A. (1993). The DNA-binding domain of two bZIP transcription factors, the Epstein-Barr virus switch gene product EB1 and Jun, is a bipartite nuclear targeting sequence. *Journal of Virology* **67**, 734–742.
- MONTALVO, E. A., COTTAM, M., HILL, S. & WANG, Y.-C. J. (1995). YY1 binds to and regulates *cis*-acting negative elements in the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter. *Journal of Virology* **69**, 4158–4165.
- PRANG, N., WOLF, H. & SCHWARZMANN, F. (1995). Epstein-Barr virus lytic replication is controlled by posttranscriptional negative regulation of BZLF1. *Journal of Virology* **69**, 2644–2648.
- ROONEY, C. M., ROWE, D. T., RAGOT, T. & FARRELL, P. J. (1989). The spliced BZLF1 gene of Epstein-Barr virus (EBV) transactivates an early EBV promoter and induces the virus productive cycle. *Journal of Virology* **63**, 3109–3116.
- SCHEPERS, A., PICH, D. & HAMMERSCHMIDT, W. (1993). Transcription factor with homology to the AP-1 family links RNA transcription and DNA replication in the lytic cycle of Epstein-Barr virus. *EMBO Journal* **12**, 3921–3929.
- SCHWARZMANN, F., PRANG, N., REICHEL, T., RINKES, B., HAIST, S., MARSCHALL, M. & WOLF, H. (1994). Negatively *cis*-acting elements in the distal part of the promoter of Epstein-Barr virus transactivator gene BZLF1. *Journal of General Virology* **75**, 1999–2006.
- SINCLAIR, A. J., BRIMMEL, M., SHANAHAN, F. & FARRELL, P. J. (1991). Pathways of activation of the Epstein-Barr virus productive cycle. *Journal of Virology* **65**, 2237–2244.
- SISTA, N. D., PAGANO, J. S., LIAO, W. & KENNEY, S. (1993). Retinoic acid is a negative regulator of the Epstein-Barr virus protein (BZLF1) that mediates disruption of latent infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **90**, 3894–3898.
- SISTA, N. D., BARRY, C., SAMPSON, K. & PAGANO, J. (1995). Physical and functional interaction of the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator with the retinoic acid receptors RAR α and RXR α . *Nucleic Acids Research* **23**, 1729–1736.
- TAKADA, K., SHIMIZU, N., SAKUMA, S. & ONO, Y. (1986). Trans activation of the latent Epstein-Barr virus (EBV) genome after transfection of the EBV DNA fragment. *Journal of Virology* **57**, 1016–1022.
- URIER, G., BUISSON, M., CHAMBARD, P. & SERGEANT, A. (1989). The Epstein-Barr virus early protein EB1 activates transcription from different responsive elements including AP-1 binding sites. *EMBO Journal* **8**, 1447–1453.
- ZHANG, Q., GUTSCH, D. & KENNEY, S. (1994). Functional and physical interaction between p53 and BZLF1. Implication for Epstein-Barr virus latency. *Molecular and Cellular Biology* **14**, 1929–1938.
- ZUR HAUSEN, H., O'NEIL, E. J., FREESE, U. K. & HECHER, E. (1978). Persisting oncogenic herpes-virus induced by tumour promoter TPA. *Nature* **272**, 373–375.

(Received 25 July 1995; Accepted 31 October 1995)



II.B- Résumé des travaux effectués lors du premier stage post-doctoral

Le virus d'Epstein-Barr et le carcinome indifférencié du nasopharynx : étude des propriétés fonctionnelles d'un mutant de EB1, Zser206

Le carcinome du nasopharynx (NPC) est une tumeur d'origine épithéliale localisée dans la partie postérieure du rhinopharynx, caractérisée par une répartition géographique particulière et une étiologie multifactorielle (pour revue, voir Le Roux et Joab, 1998). Il semble que des facteurs génétiques, environnementaux et l'infection par EBV agissent comme cofacteurs dans la formation ou l'évolution de cette tumeur. L'EBV a été le premier virus à avoir été associé à des pathologies malignes humaines. Son rôle dans la genèse du NPC est encore inconnu. Le produit de certains de ses gènes pourrait affecter le fonctionnement cellulaire. Parmi les protéines virales détectées dans les biopsies de NPC seule la protéine membranaire, LMP1, exprimée pendant la latence est définie comme oncogène. Cependant plusieurs observations suggèrent qu'une réactivation virale précède ou accompagne le développement du NPC. Cette réactivation peut se produire dans les cellules épithéliales et/ou dans les lymphocytes B infectés. La forme linéaire de l'ADN viral, spécifique du cycle productif de l'EBV a été mise en évidence dans des biopsies de NPC. Des particules infectieuses ont pu être isolées à partir de cellules épithéliales de NPC. Des patients atteints d'un NPC présentent un profil sérologique anti-EBV particulier avec un titre élevé d'anticorps dirigé contre des protéines du cycle lytique. Une réactivation de l'EBV est souvent observée dans des biopsies de NPC mais il s'agit le plus souvent d'un cycle abortif qui pourrait donc ne pas toujours être lié à la mort de la cellule. Ces résultats nous ont conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle des protéines précoces du cycle lytique pourraient jouer un rôle dans la genèse du NPC. En particulier l'expression du gène BMLF1, codant pour EB2 a été mise en évidence dans des biopsies de NPC. Comme nous l'avons montré précédemment, ce facteur post-transcriptionnel possède des propriétés oncogéniques.

La protéine EB1 a aussi été détectée dans des cellules tumorales de biopsies de NPC. Même si cette protéine présente des homologies avec les oncogènes cellulaires de la famille Jun/Fos, aucune propriété transformante ne lui a été assignée jusqu'à présent. Elle pourrait cependant jouer un rôle indirect dans les mécanismes de transformation cellulaire. En effet des travaux ont montré que EB1 peut activer l'expression de l'oncogène *cfos*, le TGF β et le collagène IV. D'autres travaux ont montré que EB1 pouvait interagir physiquement avec des facteurs cellulaires et modifier leur fonction. Ce sont les récepteurs à l'acide rétinoïque, la protéine suppresseur de tumeur P53 et la sous unité P65 du facteur de transcription NF κ B. Ces interactions impliquent le domaine de dimérisation de EB1 et conduisent toujours à une inhibition réciproque de ces protéines.

Lors de l'étude de la séquence du gène codant pour EB1 dans une grande série de malades atteints de NPC, l'équipe du Dr Joab a observé un changement d'une alanine en une sérine au niveau de l'acide aminé 206 dans plus de 70% des cas de NPC d'Italie et d'Afrique du Nord contre 10 à 18% des cas atteints d'autres pathologies ou des porteurs sains de la même région. L'acide aminé 206 est localisé dans le

domaine de dimérisation de la protéine qui est aussi impliqué dans l'interaction de EB1 avec les protéines cellulaires citées précédemment. Cette mutation, non conservatrice, est toujours accompagnée d'une mutation dans le deuxième intron du gène codant pour EB1. Ces résultats laissant supposer des propriétés spécifiques de ce virus variant et plus particulièrement de la protéine EB1 modifiée (Zser206).

L'objectif principal de mon stage post-doctoral a été de caractériser les propriétés du gène mutant aux niveaux expression et fonction. EB1 ou Zser206 ont été exprimées dans des cellules épithéliales après transfection de vecteurs d'expression contenant soit la séquence génomique soit l'ADNc codant ces protéines. Nous avons détecté 10 fois plus d'ARNm et de protéine en utilisant le vecteur contenant la séquence génomique suggérant la présence d'un enhancer dans un des introns du gène. Aucune différence en quantité d'ARNm, en stabilité des messagers et en stabilité des protéines n'a été observée entre EB1 et Zser206.

Les capacités transactivatrices de ces deux protéines ont été comparées en cotransfectant des cellules par des vecteurs d'expression pour EB1 ou Zser206 et différents promoteurs de gènes viraux immédiats précoces (PZ, PR), et précoces (BHLF1, BHRF1, BMRF1), ou du gène cellulaire TGF β , clonés en amont du gène reporteur CAT. Nous n'avons pas pu déterminer de différence entre ces deux protéines pour ce qui est de leur capacité transactivatrice.

En transfectant des cellules infectées par EBV avec des vecteurs d'expression pour EB1 et Zser206 nous avons observé une induction similaire de l'expression des gènes du cycle lytique et de la réplication du génome viral.

Enfin nous avons comparé les interactions entre EB1 et le variant Zser206 avec les protéines cellulaires p53, NF κ B et RXR/RAR dans un système de chromatographie d'affinité. Là encore aucune différence entre ces deux protéines dans leur capacité à s'homodimériser ou à interagir avec des protéines cellulaires n'a été mise en évidence (travail effectué dans le laboratoire du Dr S. Kenney, Université de Caroline du Nord, Chapel Hill, USA, lors d'un séjour de trois mois).

De précédentes études au laboratoire ont montré qu'il y a sélection d'un virus variant dans les NPC du contour méditerranéen. La protéine EB1 exprimée à partir de ce variant contient un changement d'une alanine en une sérine au niveau de l'acide aminé 206, situé dans le domaine de dimérisation de la protéine. Nous n'avons pas été en mesure, pour le moment, de caractériser une spécificité de Zser206 dans les modèles fonctionnels connus jusqu'à présent.

Revue 1 : Le Roux et Joab., 1998





REVIEW

Epstein-Barr Virus and Nasopharyngeal Carcinoma

Frédérique Le Roux and Irène Joab*

*CNRS URA 1301, Institut Gustave Roussy,
39 rue Camille Desmoulins 94800 Villejuif, France*

(Epstein-Barr Virus Report 1998;5:53-7)

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a tumour derived from the epithelium of the nasopharyngeal surface, in particular in the Rosenmüller fossa. The distribution of NPC is endemic in several regions of the world and its aetiology appears to be multifactorial implying genetic and environmental factors and an association with the Epstein-Barr virus (EBV).

Histology

According to the World Health Organization (WHO), NPC can be classified into three major groups: keratinizing squamous cell carcinoma, non-keratinizing squamous cell carcinoma and undifferentiated carcinoma of the nasopharyngeal type, UCNT (1). A characteristic feature of the tumour is a massive lymphatic infiltration mainly by T lymphoid cells.

Epidemiology

One of the most striking characteristics of the disease is its geographical distribution. In South East China, in particular among the Cantonese population of the Guangzhou area, NPC is endemic with an incidence which varies from 30 to 80 per 100 000 per year. An intermediate incidence (8 to 12 per 100 000 per year) is found in other regions of South-East Asia, in the Mediterranean basin and among Alaska and Greenland Eskimos. Outside the endemic regions, the incidence observed is low (0.5 to 2 per 100 000 per year). The incidence peak occurs at 40 to 50 years. However, a bimodal age distribution is seen in North Africa with an additional peak among young people of 10-20 years. NPC is predominantly seen in males, with a male-female ratio of 3:1 (2).

Aetiology

The aetiology of NPC is multifactorial involving virological, environmental and genetic factors. However, it has been

* author for correspondence

difficult to define the individual role of genetics and environment in the development of the disease. The observation that the Chinese who migrated to low-risk areas exhibit a significantly reduced incidence of NPC compared to their counterparts living in China, strongly implicates the role of environmental factors in the aetiology of the disease. However, the finding that second and third generation migrants maintain an increased risk of developing NPC compared to Caucasians, suggests the involvement of inherited genetic factors in NPC pathogenesis (3).

Additional evidence in favour of a genetic factor also comes from familial clusters of NPC. The increased risk for NPC in Chinese has been associated with certain Chinese-related HLA antigen profiles (inherited haplotypes HLA-A2Bw46, A19B17) and fewer at the A11 or B13 loci (4). A linkage study carried out on affected sib pairs suggests that a gene closely linked to the HLA locus confers a higher risk for NPC (5). The cytochrome P450 2E1 enzyme (CYP2E1) is known to activate nitrosamines and other carcinogens that are possibly involved in the development of this disease. Individuals homozygous for an allele of the CYP2E1 gene were found to have an increased relative risk for NPC (6). The cytogenetic abnormalities, consisting of non-random deletions on the short arm of chromosome 3 resulting in loss of heterozygosity at two chromosomal loci (3p25 and 3p14) have been detected by using RFLP analysis, suggesting the presence of a tumour suppressor gene at these loci (7-8). Moreover, alterations in the p16 gene (located at 9p21-22), which encodes a cell cycle regulator protein, has also been reported suggesting that inactivation of the p16 gene might play a role in the development of NPC (9). Point mutations of the p53 gene are rarely found although p53 over expression has been reported in the majority of cases (10-11).

The ingestion of salted fish which contains a significant amount of volatile nitrosamines, which could activate EBV

has also been associated with an increased risk for NPC (12). It was also suggested that the presence of specific lignin fractions in high-risk food items could activate the lytic replication of EBV and this might be an important factor in the development of NPC (13).

Serology

The first link between NPC and EBV came from the observation that sera of NPC patients contained precipitating antibodies directed against EBV-infected cells (14). Many studies have demonstrated elevated levels of IgG and IgA antibodies directed against viral capsid antigen (VCA) and the diffuse component of early antigen (EA) in NPC patients. Serological evaluation of these antibodies may prove useful as a screening method for the detecting the disease, particularly in high-risk areas. Serological tests for antibodies against the recombinant forms of VCA and EA have been derived and diagnostic applications of different recombinant antigens, such as EBV-encoded membrane antigen (gp350/220), alkaline DNase, thymidine kinase, ribonucleotide reductase, EBNA-1 and -2, and LMP2A and B in NPC have been studied (15).

IgG antibodies to the EBV replication activator (ZEBRA) were identified in more than 90% of NPC patients (compared to 3% in control individuals) (16). IgG/ZEBRA antibodies were also seen in 25% of the patients who do not carry IgA/VCA antibodies (17). An increase in the titre of IgG/ZEBRA antibodies precedes clinical detection of lung and liver metastasis in 62% of the cases (18). In this respect, IgG/ZEBRA antibodies are more sensitive than other conventional serological markers.

The increase of antibodies to the lytic gene products in the sera of patients, suggest that viral replication (within the tumour or at another site) precedes or accompanies the appearance or the development of the tumour.

EBV DNA genome

EBV DNA is clonal, within the tumour which indicates that a clonal proliferation of latently infected cells occurred. Closed episomal DNA is predominant but linear forms, specific for the productive cycle, have also been detected (19). Dysplasia is also associated with clonal EBV suggesting that EBV infection occurs at an early stage of carcinogenesis, prior to the development of invasive carcinoma and that viral infection is an essential factor in its development (20).

EBV expression

As it is likely that EBV is a contributing factor in the development of NPC, significant efforts have been made to characterise viral expression in the tumour and to elaborate on protein functions. In B cells immortalised by EBV, the

latent EBV genome expresses the viral genes encoding 6 nuclear antigens, EBNA-1, -2, -3A, -3B, 3C, LP, 3 latent membrane proteins LMP-1, 2A, 2B and 2 EBV encoded small, non polyadenylated RNAs EBER-1, -2 (for a review see 21).

In general, NPC cells express high levels of the EBER transcripts, however in rare cases, NPC can be EBERs negative (22).

EBNA1 is expressed in all the EBV-positive NPC. The selective expression of EBNA1 is associated with the presence of an EBNA1 mRNA with the BamHI Q/U/K splice structure (23-24). EBNA1 binding to EBV origin of replication is required to obtain replication function and episomal persistence. EBNA1 was shown to predispose B lymphocytes to lymphomagenesis in transgenic mice (25) and to enhance tumorigenicity and growth rate of NPC cells in immunodeficient mice (26).

LMP1 is the only latent gene which conforms to the classical description of an oncogene and is essential for immortalization of B lymphocytes. LMP1 protein is present in 50-65% of NPC. However, it is detected in all the premalignant lesions tested, suggesting that it might contribute to proliferation of the cells (20). A promoter of the LMP1 gene that is specifically activated in epithelial cells has been identified (27).

The properties of LMP1 have been extensively studied (for a review see 28). Briefly, LMP1 was proposed to be a constitutively active receptor, influencing mitogenic signal transduction pathways in EBV-infected cells. LMP1 was shown to trigger NF- κ B activity through two intracytoplasmic domains CTAR1 and CTAR2 (C-terminal activating regions 1 and 2) in part through a pathway that involves the recruitment of TNF-R receptor associated factors (TRAFs). Recently, it was shown that CTAR2 triggers the activity of the N-terminal activation domain of c-jun through the jun N-terminal kinase (JNK) pathway (24, 29-30).

LMP1 affects the expression of different cellular proteins such as the anti-apoptotic proteins A20, Mcl-1 and bcl-2. LMP1 induces the expression of CD11a/CD18, CD23, CD39, CD40, CD44, CD54, vimentin, transferrin receptor, MHC class II, IL-10, EGF receptor, pRb hyper phosphorylation, expression of cyclin D2, a calcium-calmodulin-dependent protein kinase and DNA synthesis.

Recently, LMP1 was shown to enhance the expression of matrix metalloproteinase 9 which is thought to play crucial roles in tumour invasion and metastasis (31). This finding could suggest that NPC in which LMP1 is expressed might use MMP9 for metastasis. However, LMP1-positive tumours grew faster and more extensively than LMP1-negative tumours, but had a better prognosis as LMP1-negative tumours since the latter recurred at a higher frequency and showed an increased tendency to metastasize (32).

LMP2 transcripts are regularly present in NPC (33). However, the visualization of the protein has not been achieved as no good antibodies are available. If the protein is indeed expressed, it could then serve as a target for specific cytotoxic T lymphocytes (CTL).

Rightward-running BamHI A RNAs have been characterized in nude mice transplanted-tumours and cDNA library from biopsies. Multiple spliced polyadenylated cytoplasmic transcripts with various size classes having different patterns of exon usage have been seen. All appear to be expressed from a novel promoter in the BamHI I region of the genome (34). The function of these RNAs remains to be determined. Since they are transcribed in an orientation opposite to a number of lytic cycle mRNAs also encoded within BamHI A, they could possibly act as 'antisense' transcripts with the capacity to control lytic cycle progression. It is possible that one or more of the open reading frames present in these cytoplasmic RNAs are translated into a protein. Antibodies recognizing the *in vitro* translation product of an open reading frame ("BARFO") near the shared 3' end of all BamHI A transcripts were detected in the serum of some NPC patients (35).

It was shown by *in situ* hybridization that a small fraction of NPC tumour cells expressed the BZLF1 gene (which encodes the ZEBRA protein), and by RT-PCR that spliced transcripts of BZLF1 gene were present in all the NPC biopsies analyzed (36). This shows that the EBV lytic cycle is reactivated in NPC, however this productive cycle is often incomplete, as the expression of lytic antigens (BRLF1, BMLF1, gp220, the lytic truncated form of LMP1 (D1LMP) varies among individual tumours (37). Thus, it could be suggested that an EBV abortive lytic cycle occurred in most of the NPC studied.

Antibody response to the BARF1 EA product has been detected in NPC patients (38) and the expression of this open reading frame was observed in NPC tumours. BARF1 was reported to encode a potential factor of growth transformation of epithelial cells. Recently, a recombinant BARF1 protein was found to bind the colony-stimulating factor 1 (CSF1) this capacity might have an implication in virus-host relationship (39).

The tumour cells themselves produce cytokines such as IL-1a and also a soluble form of CD23 which raises the possibility that these tumour products may actually promote lymphocytic infiltration.

Interestingly, over expression of the bcl-2 oncogene product has been found in about 80% of the cases of UCNT(40).

EBV strain variations in NPC

In the human population, EBV exists in two genetic forms, usually referred as type A and type B. The study by Chen *et*

al. (41) showed that the A type of EBV is the prevalent form in NPC biopsies obtained from the high incidence area in Southern China. Other variants of EBV were also found to be associated with NPC, a type C variant which lacks the BamHI site located between the BamHI WI* and I* regions and a type f variant has an additional BamHI site in the BamHI F fragment.

A number of mutations, relative to the prototype B95-8, in the sequences of EBNA1 genes derived from an NPC xenograft and numerous patient biopsies were identified. Although many of the nucleotide changes would result in non-conservative amino acid alterations in functionally regions, the effect observed on the functions of EBNA1 was negligible (42-43).

Naturally occurring EBV genome contains either two or three copies of a 29-bp tandem repeat sequence in the first intron of the BZLF1 gene. Chen *et al.* (44) described a difference between epithelial tissue and peripheral blood cells (PBC) distribution of those two types while in other studies (45) the three 29 bp repeat variant was identified with an similar frequency (74%) in both NPC biopsies and PBC of healthy blood donors from Hong Kong and China. BZLF1 sequence was shown to differ in B95-8 (Z95) and P3HR1 (ZP3) cell lines by 8 amino acids. In 72% of the NPC biopsies from European and North African patients, a change of alanine 206 to a serine (Zser206) was observed in the Z95 sequence. The variant Zser206 is observed in a significantly lower percentage ($p < 0.001$) in other EBV positive tissues from individuals of the same region (10-33%). On the contrary, EBV found in NPC biopsies and PBC from Asian individuals was predominantly of the ZP3 type (45).

The BNLF1 gene (which encodes LMP1 protein) from a nude-mouse passaged CAO strain and from NPC biopsies of Taiwanese patients also showed variations resulting in structural and functional differences in the protein. CAO-LMP1 was more tumorigenic in the human keratinocyte Rhek-1 than the LMP1 gene from the prototype B95-8 strain (46). Variations in the LMP1 sequence from different NPC biopsies have been observed: multiple single-base mutations were detected in the N and C terminal coding regions as well as extra copies of the 33 bp sequence and two deletions of 15 and 30 bp in the C-terminal regions (47). A recent study of Johnson *et al.* (48) showed that while the CAO-LMP1 is functionally distinct from the prototype B95-LMP1 in lymphocytes, the 10-amino-acid deletion appears not to be directly responsible. The 30 bp deletion near the 3' end of the LMP1 gene is observed in the majority of EBV from NPC (86%) and peripheral blood cells (86%) of the Asian individuals whereas the deletion is detected at a significantly lower percentage ($p < 0.001$) in NPC biopsies from European

and North African patients (56%) as well as in the lymphocytes of control individuals of the corresponding region (36 and 55% respectively).

Taking into account the number of patients affected in the world, NPC should be considered as an important malignancy. The exact relationship between EBV and this disease continues to unfold and is far from being fully understood.

Acknowledgement

The authors thank Audrey Alberga for careful reading of the manuscript.

References

- Ferlito A, Weiss LM, Rinaldo A, Carbone A, Devaney KO, MacMillan C, Barnes L. Lymphoepithelial carcinoma of the larynx, hypopharynx, and trachea. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106:437-44.
- Levine PH, Connelly R. Epidemiology of nasopharyngeal cancer. In: Wittes RE, Head and neck cancer. New York: John Wiley, 1985:13-34.
- Buell P. The effect of migration on the risk of nasopharyngeal cancer among Chinese. *Cancer Res* 1974;34:1189-1191.
- Liebowitz D. Nasopharyngeal carcinoma: the Epstein-Barr virus association. *Semin Oncol* 1994;21:376-81.
- Lu SJ, Day NE, Degos L, Lepage V, Wang PC, Chan SH, et al. The G Linkage of a nasopharyngeal carcinoma susceptibility locus to the HLA region. *Nature* 1990;346:470-1.
- Hildesheim A, Anderson LM, Chen CJ, Cheng YJ, Brinton LA, Daly AK, et al. CYP2E1 genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1207-12.
- Huang DP, Lo KW, Choi PH, Ng AY, Tsao SY, Yiu GK, Lee JC. Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 3 in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1991;54:91-9.
- Choi PHK, Suen MWM, Huang DP, Lo KW, Lee JCK. Nasopharyngeal carcinoma - genetic changes, Epstein-Barr virus infection, or both - a clinical and molecular study of 36 patients. *Cancer* 1993;72:2873-8.
- Lo KW, Huang DP, Lau KM. p16 gene alterations in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 1995;55:2039-43.
- Effert P, McCoy R, Abdel-Hamid M, Flynn K, Zhang Q, Busson P, et al. Alteration of the p53 gene in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* 1992;66:3768-75.
- Niedobitek G, Agathangelou A, Barber P, Smallman LA, Jones EL, Young LS. p53 overexpression and Epstein-Barr virus infection in undifferentiated and squamous cell nasopharyngeal carcinomas. *J Pathol* 1993;170:457-61.
- Yu MC, Ho JHC, Lai SH, Henderson BE. Cantonese-style salted fish as a cause of nasopharyngeal carcinoma: report of a case-control study in Hong-Kong. *Cancer Res* 1986;46:956-61.
- Bouvier G, Hergenbahn M, Polack A, Bornkamm GW, Dethlefsen G, Bartsch H. Characterization of macromolecular lignins as Epstein-Barr virus inducer in foodstuff associated with nasopharyngeal carcinoma risk. *Carcinogenesis* 1995;16:1879-85.
- Old LJ, Boyse EA, Oettgen HF, de Harven E, Geering G, Williamson B, Clifford P. Precipitating antibody in human serum to an antigen present in cultured Burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1966;56:1699-704.
- Yip T, Lau WH, Ngan R, Poon YF, Joab I, Cochet C, et al. Role of Epstein-Barr virus in the prognosis of nasopharyngeal carcinoma: the present and the future. *Epstein-Barr Virus Rep* 1996;3:25-33.
- Joab I, Nicolas JC, Schwaab G, de The G, Clause B, Perricaudet M, Zeng Y. Detection of anti-Epstein-Barr virus transactivator, ZEBRA, antibodies in sera from patients with nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 1991;48:647-49.
- Mathew A, Cheng HM, Sam CK, Joab I, Prasad U, Cochet C. A high incidence of serum IgG antibodies to the Epstein-Barr virus replication activator protein in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 1994;38:68-70.
- Yip TTC, Ngan RKC, Lau WH, Poon YF, Joab I, Cochet C, Cheng AKP. A possible prognostic role of immunoglobulin-G antibody against recombinant Epstein-Barr virus BZLF-1 transactivator protein ZEBRA in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 1994;74:2414-24.
- Raab-Traub N, Flynn K. The structure of the termini of Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell* 1986;47:883-889.
- Pathmanathan R, Prasad U, Sadler R, Flynn K, Raab-Traub N. Clonal proliferations of cells infected with Epstein-Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma. *New Engl J Med* 1995;333:693-8.
- Kieff E. Epstein-Barr virus and its replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:2343-96.
- Takeuchi H, Kobayashi R, Hasegawa M, Hirai K. Detection of latent Epstein-Barr virus (EBV) DNA in paraffin sections of nasopharyngeal carcinomas expressing no EBV-encoded small RNAs using in situ PCR. *Arch Virol* 1997;142:1743-56.
- Brooks L, Yao QY, Rickinson AB, Young LS. Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 transcripts. *J Virol* 1992;66:2689-97.
- Smith PR, Griffin BE. Transcription of the Epstein-Barr virus gene EBNA-1 from different promoters in nasopharyngeal carcinoma and B-lymphoblastoid cells. *J Virol* 1992;66:706-14.
- Wilson JB, Bell JL, Levine AJ. Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. *EMBO J* 1996;15:3117-26.
- Sheu LF, Chen A, Meng CL, Ho KC, Lee WH, Leu FJ, Chao CF. Enhanced malignant progression of nasopharyngeal carcinoma cells mediated by the expression of Epstein-Barr nuclear antigen 1 in vivo. *J Pathol* 1996;180:243-8.
- Chang MH, Ng CK, Lin YJ, Liang CL, Chung PJ, Chen ML, et al. Identification of a promoter for the latent membrane protein 1 gene of Epstein-Barr virus that is specifically activated in human epithelial cells. *DNA Cell Biol* 1997;16:829-37.
- Mosialos G. Signal transduction by the Epstein-Barr virus latent membrane protein-1. *Epstein-Barr Virus Rep* 1997;4:121-6.
- Kieser A, Kilger E, Gires O, Ueffing M, Kolch W, Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade. *EMBO J* 1997;16:6478-85.

30. Eliopoulos AG, Young LS. Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *Oncogene* 1998;16:1731-42.
31. Yoshizaki T, Sato H, Furukawa M, Pagano JS. The expression of matrix metalloproteinase 9 is enhanced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3621-6.
32. Hu LF, Chen F, Zhen QF, Zhang YW, Luo Y, Zheng X, *et al.* Differences in the growth pattern and clinical course of EBV-LMP1 expressing and nonexpressing nasopharyngeal carcinomas. *Eur J Cancer* 1995;31A:658-60.
33. Busson P, McCoy R, Sadler R, Gilligan K, Tursz T, Raab-Traub N. Consistent transcription of the Epstein-Barr virus LMP2 gene in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* 1992;66:3257-62.
34. Smith PR, Gao Y, Karran L, Jones MD, Snudden D, Griffin BE. Complex nature of the major viral polyadenylated transcripts in Epstein-Barr virus-associated tumors. *J Virol* 1993;67:3217-25.
35. Gilligan KJ, Rajadurai P, Lin JC, Busson P, Abdel-Hamid M, Prasad U, *et al.* Expression of the Epstein-Barr virus BamHI A fragment in nasopharyngeal carcinoma: evidence for a viral protein expressed in vivo. *J Virol* 1991;65:6252-9.
36. Cochet C, Martel-Renoir D, Grunewald V, Bosq J, Cochet G, Schwaab G, *et al.* Expression of the Epstein-Barr virus immediate early gene, BZLF1, in nasopharyngeal carcinoma tumour cells. *Virology* 1993;197:358-65.
37. Martel-Renoir D, Grunewald V, Touitou R, Schwaab G, Joab I. Qualitative analysis of the expression of Epstein-Barr virus lytic genes in nasopharyngeal carcinoma biopsies. *J Gen Virol* 1995;76:1401-8.
38. Tanner JE, Wei MX, Alfieri C, Ahmad A, Taylor P, Ooka T, Menezes J. Antibody and antibody-dependent cellular cytotoxicity responses against the BamHI a rightward open-reading frame-1 protein of Epstein-Barr Virus (EBV) in EBV-associated disorders. *J Infect Dis* 1997;175:38-46.
39. Strockbine LD, Cohen JI, Farrah T, Lyman SD, Wagener F, Dubose RF, *et al.* The Epstein-Barr virus BARF1 gene encodes a novel, soluble colony-stimulating factor-1 receptor. *J Virol* 1998;72:4015-21.
40. Lu QL, Elia G, Lucas S, Thomas JA. Bcl-2 proto-oncogene expression in Epstein-Barr-virus-associated nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 1993;53:29-35.
41. Chen XY, Pepper SD, Arrand JR. Prevalence of the A and B types of Epstein-Barr virus DNA in nasopharyngeal carcinoma biopsies from southern China. *J Gen Virol* 1992;73 :463-6.
42. Snudden DK, Smith PR, Lai D, Ng MH, Griffin BE. Alterations in the structure of the EBV nuclear antigen, EBNA1, in epithelial cell tumours. *Oncogene* 1995;10:1545-1552.
43. Gutierrez MI, Raj A, Spangler G, Sharma A, Hussain A, Judde JG, *et al.* Sequence variations in EBNA1 may dictate tissue distribution of Epstein-Barr virus in normal and tumor cells. *J Gen Virol* 1997;78:1663-70.
44. Chen HL, Lung ML, Chan KH, Griffin BE, Ng MH. Tissue distribution of Epstein-Barr virus genotypes. *J Virol* 1996;70:7301-5.
45. Grunewald V, Bonnet M, Boutin S, Yip T, Louzir H, Levrero M, *et al.* Amino-acid change in the Epstein-Barr-virus zebra protein in undifferentiated nasopharyngeal carcinomas from Europe and North Africa. *Int J Cancer* 1998;75:497-503.
46. Hu LF, Chen F, Zheng X, Ernberg I, Cao SL, Christensson B, *et al.* Clonability and tumorigenicity of human epithelial cells expressing the EBV encoded membrane protein LMP1. *Oncogene* 1993;8:1575-83.
47. Miller WE, Edwards RH, Walling DM, Raabtraub N. Sequence variation in the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *J Gen Virol* 1995;76:1305-6.
48. Johnson RJ, Stack M, Hazlewood SA, Jones M, Blackmore CG, Hu LF, Rowe M. The 30-base-pair deletion in Chinese variants of the Epstein-Barr virus LMP1 gene is not the major effector of functional differences between variant LMP1 genes in human lymphocytes. *J Virol* 1998;72:4038-48.

II.C- Résumé des travaux effectués lors du second stage post-doctoral

Taxonomie et épidémiologie moléculaire du parasite *Marteilia refringens* pathogène de l'huître plate *Ostrea edulis*

Le phylum des Paramyxia comprend un ensemble de parasites d'invertébrés marins, caractérisé par la différenciation de cellules secondaires (sporanges) à l'intérieur d'une cellule primaire et de cellules tertiaires (spores) à l'intérieur de ces sporanges, spores constituées de plusieurs cellules emboîtées les unes dans les autres provenant de divisions endogènes successives à partir d'une cellule souche. Ces parasites présentent une forte spécificité d'hôte et de localisation tissulaire. Ils se distinguent par le nombre de spores à l'intérieur du sporange, le nombre de cellules à l'intérieur de la spore ainsi que l'espèce hôte (polychète, mollusque ou crustacé). Le phylum des Paramyxia contient deux classes, la classe des Paramyxidea contenant le seul genre *Paramyxa* et une espèce décrite *Paramyxa paradoxa*, la classe des Marteliidea comprenant trois genres *Martelioides*, *Marteilia* et *Paramyxa*.

Les espèces du genre *Marteilia* ont été particulièrement étudiées en raison de leur pathogénicité sur des bivalves commercialisés. *Marteilia refringens*, agent étiologique de la « maladie des Abers », a entraîné des mortalités massives d'huîtres plates *Ostrea edulis* à partir des années 70 et continue de limiter ces élevages en Europe. En Australie, *Marteilia sydneyi* est responsable de la maladie « QX disease » chez *Saccostrea commercialis*. Ces deux espèces de parasites ont donc été classées comme agents pathogènes à déclaration obligatoire par l'office international des épizooties.

En Europe, *M. refringens* a été détecté chez d'autres bivalves comme les moules *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis*. Une autre espèce du même genre, *Marteilia maurini*, a été décrite chez des *M. galloprovincialis* et *O. edulis*. Le diagnostic de ces différentes espèces était basé sur des critères ultrastructuraux et de spécificité d'hôtes, sujet de controverse car un même parasite peut avoir une morphologie différente selon l'hôte infecté.

L'objectif de mon travail a été, par une approche de biologie moléculaire, d'éclaircir la position taxonomique des parasites du genre *Marteilia*. Il nous fallait définir s'il existe une ou plusieurs espèces en Europe et développer des outils diagnostiques pertinents et sensibles pour détecter cette/ces espèce(s). L'ensemble de ce travail ayant pour application la prévention du transfert des maladies depuis leur zone d'enzootie vers des zones indemnes.

La séquence du gène codant pour la petite sous unité ribosomique (18S) a été utilisée pour clarifier la phylogénie et la taxonomie du parasite *M. refringens* (Berthe *et al.*, 2000). L'ADN cible a été obtenu à partir de sporanges du parasite isolé de moules, *M. edulis* et d'huître plate, *O. edulis*, naturellement infectées. L'identité de la séquence obtenue a été vérifiée par hybridation *in situ* en utilisant comme sonde la partie la plus variable de la séquence 18S (250pb). La séquence obtenue s'avère très différente de celles connues chez les organismes eucaryotes, y compris Myxosporidies et Haplosporidies desquelles *M. refringens* avait

initialement été rapproché. C'est pourquoi ces résultats supportent et valident l'existence d'un phylum indépendant de celui des Paramyxa. Les séquences obtenues pour les isolats de moules et d'huîtres sont identiques.

Au cours d'examens de routine de moules, *M. galloprovincialis*, cultivées dans le Nord de l'Adriatique, la présence de parasites du genre *Marteilia* a été observée avec une prévalence de l'ordre de 5%. L'identification du parasite détecté chez les moules a été confirmée par hybridation *in situ* à l'aide d'une sonde spécifique du genre *Marteilia* (Zrncic *et al.*, 2001). Dans la même zone, les huîtres plates, *O. edulis*, étaient indemnes d'infection à *Marteilia*. Cette source du parasite chez la moule méditerranéenne est proche de celle de la description initiale de l'espèce *M. maurini*. De ce point de vue, ce résultat est intéressant car il pourrait permettre de clarifier la taxonomie du genre *Marteilia* par une approche moléculaire.

Les données épidémiologiques sur la répartition du parasite en Europe et chez les espèces hôtes suggèrent fortement l'existence de différents types du parasite. J'ai alors recherché l'existence de polymorphisme dans la région de l'intervalle transcrit (ITS1) du gène codant pour les sous unités ribosomiques (Le Roux *et al.*, 2001). Les séquences obtenues démontrent très clairement un dimorphisme pour cette région du génome, lié à l'espèce hôte de l'isolat. Ce résultat vient renforcer la reconnaissance de deux espèces du genre *Marteilia* en Europe, le type « O » correspondant à *M. refringens*, le type « M » correspondant à *M. maurini*. Un schéma conceptuel du flux génique entre ces deux espèces en cours de spéciation alloxénique a été proposé et devrait permettre de clarifier le rôle de la moule dans la propagation de la marteiliose à *M. refringens*.

Une autre question non résolue concernant ce parasite est celle de son cycle de vie et donc de sa transmission. Plusieurs résultats conduisent à émettre l'hypothèse d'un cycle hétéroxène. La recherche d'hôtes intermédiaires pour *M. refringens* nécessitait le développement d'outils de détection moléculaires circonvenant les difficultés techniques inhérentes à la microscopie. La séquence du gène 18S nous a permis de mettre au point des sondes d'hybridation *in situ* spécifiques du genre *Marteilia* (Le Roux *et al.*, 1999, Kleeman *et al.*, 2002), les séquences ITS-1 des sondes spécifiques des espèces *refringens* et *sydneyi*. De même des amorces PCR ont été définies pour amplifier de façon spécifique l'une des espèces du genre *Martelia*.

La stratégie d'utilisation de différentes espèces animales par le parasite *M. refringens* pour assurer son cycle de vie a fait l'objet d'une thèse menée au laboratoire par Corinne Audemard que j'ai encadrée pour la partie moléculaire de son travail. Cette recherche a pu être réalisée par l'application des outils moléculaires (PCR, hybridation *in situ*) sur un modèle à biodiversité réduite, les claires ostréicoles. Cette approche a permis d'identifier un nouvel hôte de *M. refringens* : le copépode *Paracartia grani*. Le site d'infection chez cette espèce est constitué par le système ovarien. La stratégie parasitaire de *M. refringens* est basée sur le cycle saisonnier de *P. grani* et ses abondances au cours de la période d'infection des huîtres. La transmission de l'huître au copépode a pu être démontrée, cependant, l'échec de transmission du copépode vers l'huître n'a pas permis d'exclure la possibilité de l'implication d'autres espèces (Audemard *et al.*, 2002).

Article 4 : Berthe & al., 2000

Phylogenetic Analysis of the Small Subunit Ribosomal RNA of *Marteilia refringens* Validates the Existence of Phylum Paramyxea (Desportes and Perkins, 1990)¹

FRANCK C. J. BERTHE,^a FRÉDÉRIQUE LE ROUX,^a ERIC PEYRETAILLADE,^b PIERRE PEYRET,^b DAVID RODRIGUEZ,^a MANOLO GOUY^c and CHRISTIAN P. VIVARÈS^b

^aLaboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER, BP 133 Ronce-Les-Bains, 17390 La Tremblade, France, and

^bLaboratoire de Protistologie moléculaire et cellulaire des parasites opportunistes, LBCP, UPRESA CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière, France, and

^cLaboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, UMR CNRS 5558, Université Claude Bernard-Lyon 1, 69622 Villeurbanne cedex, France

ABSTRACT. *Marteilia refringens* is recognized as one of the most significant pathogens of bivalve molluscs. The nucleotide sequence of the small subunit ribosomal RNA gene of *Marteilia refringens* is used to elucidate the phylogenetic position of the phylum Paramyxea. Genomic DNA was extracted from sporangia of *Marteilia*, purified from infected blue mussels, *Mytilus edulis*, and flat oysters, *Ostrea edulis*. The sequences obtained from *Marteilia* species purified from both oysters and mussels were identical. The sequence identity was confirmed by in situ hybridization using a DNA probe targeted to a variable region of the ribosomal DNA. The small subunit ribosomal RNA gene sequence of *M. refringens* is very different from all known sequences of eukaryotic organisms, including those of myxosporians and haplosporians. Therefore, the phylum Paramyxea should continue to be recognized as an independent eukaryotic phylum.

Key Words. DNA probe, *Mytilus edulis*, *Ostrea edulis*, rRNA gene sequence.

SINCE 1968, *Marteilia refringens* (Grizel et al. 1974) has been causing serious mortalities among cultured molluscs in Europe (Fuentes et al. 1995; Robert et al. 1991). Similarly, a related organism, *Marteilia sydneyi* (Perkins and Wolf 1976), is responsible for mass mortalities of *Saccostrea commercialis* in Australia (Adlard and Ernst 1995). The diagnosis of these two species is easily achieved by classical histological methods. *Marteilia sydneyi* may be distinguished from *Marteilia refringens* by the number of secondary and tertiary cells in the characteristic cell-within-cell structure of these parasites.

The differential diagnosis of the two main species of *Marteilia* spp. found in Europe (*M. refringens* in oysters and *Marteilia maurini* in mussels) was based on ultrastructural characteristics and host specificity (Comps, Grizel, and Papayanni 1982; Figueras and Montes 1988; Grizel et al. 1974). However, host specificity was discarded when *M. refringens* was found in *Mytilus galloprovincialis* (Villalba et al. 1993). Moreover, a recent study (Longshaw, pers. commun.) has challenged the criteria used for the identification of species of *Marteilia* (Auffret and Poder 1983; Comps, Grizel, and Papayanni 1982; Perkins 1976; Perkins and Wolf 1976). Longshaw (pers. commun.) has concluded that *M. maurini* (from hosts *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*) cannot be separated from *M. refringens* (host: *Ostrea edulis*) using current ultrastructural criteria. Thus, there is some doubt that *M. maurini*, which was described as the *Marteilia* species parasitizing mussels, is a different species from *M. refringens*.

Light and electron microscopy have several limitations in the determination of taxonomic boundaries of these parasites (Auffret and Poder 1983; Comps et al. 1975; Tigé and Rabouin 1976). *Marteilia refringens* has been included in the fungal order of Chytridiales by Herrbach (1971), in the Microspora or the lower fungi (Grizel et al. 1974), and in the Labyrinthomyxa by Grizel and Tigé (1977). The genus, *Marteilia*, has been linked with either the haplosporidians because of the presence of membrane-bound granules similar to haplosporosomes (Comps 1970; Perkins 1976) or the myxosporians due to the process of development characterized by a trend towards pluricellularity with the early individualization of somatic elements (Desportes 1984; Desportes and Ginsburger-Vogel 1977; Des-

portes and Lom 1981). Corliss (1984), reviewing the kingdom Protista, considered the phylum Asctospora, created by Sprague (1979) to include Haplosporea and Paramyxea (Table 1a), as a polyphyletic assemblage requiring more study. Recently, Desportes and Perkins (1990) created the phylum Paramyxea with four genera *Marteilia*, *Paramarteilia*, *Marteilioides*, and *Paramyxa* (Table 1b).

Sequencing genes of taxonomic value may help to resolve the taxonomic position of *M. refringens* and its relatives. We report here the nucleotide sequence and a phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) gene of *M. refringens* purified from infected mussels, *M. edulis* and oysters, *O. edulis*.

MATERIALS AND METHODS

Purification of the parasite and DNA preparation. *Marteilia* cells were obtained from naturally infected mussels, *Mytilus edulis*, originating from La Trinité river (Brittany, France) and oysters, *Ostrea edulis*, originating from Oléron Island (Charente maritime, France). Prior to purification of *M. refringens* cells from mussels, prevalence was individually checked by means of digestive gland imprints. Purification of the parasite was carried out following Mialhe et al. (1985) and Robledo et al. (1995) with minor modifications. Genomic DNA was extracted from purified *M. refringens* sporangia. Cells were resuspended in 500 µl of extraction buffer (NaCl 100 mM, EDTA 25 mM, pH 8, SDS 0.5%) with proteinase K (100 µg/ml). After an overnight incubation at 50 °C, DNA was extracted using a standard phenol-chloroform protocol.

DNA amplification, cloning and sequencing. A DNA fragment of approximately 1200 bp was amplified using two oligodeoxynucleotide primers designed in conserved rDNA regions, 530f, 5'-GTGCCAGC(C/A)GCCGCGG-3' (Vossbrinck et al. 1993) and rMed1, 5'-TGATTCCTTCTGCAGGTT-CACCTAC-3' (Medlin et al. 1988). PCR reactions were carried out in 50 µl according to standard conditions of the Goldstar Taq polymerase (Eurogentec). After denaturation of DNA at 94 °C for 5 min, 35 cycles were run with a Perkin Elmer 2400 apparatus as follows: denaturation at 94 °C for 20 s, annealing at 50 °C for 30 s, and elongation at 72 °C for 1 min. A further elongation step of 30 min at 72 °C was performed. Amplified products were analyzed electrophoretically on 1% agarose gel and cloned into pGEM-T Easy Vector System (Promega, Madison, WI). Recombinant plasmids were sequenced by the Sanger method (Sanger, Nicklen, and Coulson 1977), using an ABI

Corresponding Author: F. Berthe—Telephone number: 33 5 46 36 98 36; Fax number: 33 5 46 36 37 52; Email: fberthe@ifremer.fr

¹ Accession number: AJ250699

Table 1. a—Phylum Ascetosporea Sprague 1979 as proposed by Desportes in 1981; b—Phylum Paramyxia as proposed by Desportes and Perkins 1990.

a—Phylum Ascetosporea Sprague, 1979
Class 1 Stellatosporea Sprague, 1979
Unicellular spores, spore wall interrupted by an apical orifice, 3 genera:
<i>Minchinia</i> , <i>Haplosporidium</i> , and <i>Urospidium</i>
Class 2 Paramyxia Levine, 1980
Multicellular spores made of cells enclosed inside each other with production of cells by endogeneous budding
Order 1 Paramyxida Chatton, 1911
Presumed meiosis with elimination of a polar globule, 1 genus <i>Paramyxia</i>
Order 2 Marteliida Desportes and Ginsburger-Vogel, 1977
Meiosis not yet observed, 2 genera <i>Marteilia</i> , <i>Paramarteilia</i> .
b—Phylum Paramyxia Desportes and Perkins, 1990
Sporulation results from series of internal cleavages within an ameboid stem cell that germinates from spores in tissues of invertebrate marine animals. Development is characterized by production of offspring cells that remain inside the parent cell.
Class 1 Marteliidea Desportes and Ginsburger-Vogel, 1977
with three genera, <i>Marteilia</i> , <i>Paramarteilia</i> , and <i>Marteilioides</i>
Class 2 Paramyxidea Chatton, 1911
presumed meiosis with elimination of a polar globule, with one genus, <i>Paramyxia</i> .

Prism Dye Terminator Cycle Sequencing kit according to the recommendations of the manufacturer (Perkin-Elmer, Foster City, CA). Thermocycling of the sequencing reactions and electrophoresis were carried out on a Gene Amp PCR system 2400 and an ABI Prism 377 Sequencer (Perkin-Elmer), respectively. Gel readings were processed using the Staden package (Staden 1996), and the resulting contigs were compared with public databases using BLAST (Altschuld et al. 1990) to confirm the sequences were from a rDNA gene. The entire coding region for SSU rDNA was amplified from DNA using a modified single specific primer PCR (SSP-PCR) technique (Shyamala and Ames 1993). Two hundred nanograms of *M. refringens* genomic DNA were completely digested with the *Apal* restriction enzyme. A 1- μ g sample of pBluescript-II SK + vector (Stratagene, La Jolla, CA) was digested using the corresponding enzyme and dephosphorylated with 10 U of calf intestine alkaline phosphatase (Eurogentec). A specific primer, determined from the 1220-bp-long fragment previously obtained, located at the 5'-end (M51: 5'-GCAATAATCCCGTGAATACCAGG-3') or at the 3'-end (M55: 5'-TGAACGTCGATGAGACTAGGG-3') and the reverse vector primer were used successfully to amplify DNA fragments of 835- and 374-bp-long, respectively. Amplified products were cloned and recombinant plasmids sequenced as described above. After alignment of the SSUrDNA sequence with those of 50 other eukaryotic species, *M. refringens*-specific primers were designed. Nearly the whole SSUrDNA region of *M. refringens* purified from *Ostrea edulis* was amplified using the two primers SS1 (5'-ATATTAATCCACGGCGTGGAC-3') and CAS2 (5'-ACGGGCGGTGTGACAAAGG-3'); this fragment was cloned and sequenced as described above.

In situ hybridization. In order to demonstrate the accuracy of the SSU rDNA sequence, a probe was synthesized to be used for in situ hybridization experiments. For probe preparation, two primers located in variable regions of the sequence were designed to specifically amplify *M. refringens* DNA by PCR. The sequences of the primers are 5'-GCCTTTCAAGACCA-CCCAGAAAGC-3' and 5'-CGAACGCAAATTGCGCAGGG-3'. The amplified PCR fragment was labelled by including Dig-dUTP (0.5 mM) in the PCR reaction mixture. The visceral mass of infected *M. edulis* was cut along a sagittal plane, and placed in Davidson's fixative AFA (alcohol, formalin, acetic acid) for

Table 2. Identification of analyzed SSU rDNA sequences

Species	Accession no.
<i>Mus musculus</i>	X00686
<i>Tenebrio molitor</i>	X07801
<i>Henneguya doori</i>	U37549
Proliferative kidney organism	U70623
<i>Mucor racemosus</i>	X54863
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	J01353
<i>Arabidopsis thaliana</i>	X16077
<i>Pyrenomonas salina</i>	X54276
<i>Oxytricha nova</i>	M14601
<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	M88521
<i>Ochromonas danica</i>	M32704
<i>Gracilaria lemaneiformis</i>	X54263
<i>Haplosporidium costale</i>	U20858
<i>Urosporidium crescens</i>	U47852
<i>Dictyostelium discoideum</i>	K02641
<i>Phreatamoeba balamuthi</i>	L23799
<i>Entamoeba histolytica</i>	X61116
<i>Trypanosoma brucei</i>	M12676
<i>Euglena gracilis</i>	M12677
<i>Physarum polycephalum</i>	X13160
<i>Naegleria gruberi</i>	M18732
<i>Hexamita inflata</i>	L07836
<i>Giardia muris</i>	X65063
<i>Tritrichomonas foetus</i>	M81842
<i>Marteilia refringens</i>	this work
<i>Ameson michaelis</i>	L15741
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	L17072

at least 24 h. The sections were subsequently treated by conventional histological procedures. Five-micron-thick sections were treated with proteinase K (100 μ g/ml) in TE buffer (Tris 50 mM, EDTA 10 mM) at 37 °C for 30 min. The slides were then dehydrated by immersion in ethanol series and air dried. The sections were prehybridized for 1 h at 42 °C with 500 μ l of hybridization buffer (4 \times SSC, 50% formamide, 1 \times Denhardt's solution, 250 μ g/ml yeast tRNA, dextran sulfate 10%). The solution was then replaced with 50 μ l of the same buffer containing 10 ng of the digoxigenin-labelled probe. The sections were covered with in situ plastic coverslips and placed on heating block at 95 °C for 5 min. The slides were then cooled on ice for 1 min before overnight hybridization at 42 °C. The sections were washed twice for 5 min in 2 \times SSC at room temp and once for 10 min in 0.4 \times SSC at 42 °C. The detection steps were performed according to manufacturer's instructions (Dig nucleic acid detection kit, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN).

Phylogenetic analysis. The SSU rDNA sequence of *M. refringens* was aligned to 442 other complete eukaryotic SSU rDNA sequences from the Ribosomal Database Project (Maidak et al. 1997) using the CLUSTALW program with default parameter values (Thompson, Higgins, and Gibson 1994) followed by some manual refinements. All these SSU rDNA sequences were first analyzed using the Neighbor-Joining method applied to Kimura's 2-parameter evolutionary distances to identify what sequences, if any, were most closely related to the *Marteilia* sequence. The *Marteilia* sequence did not appear to be specifically related to any such sequence to the exclusion of other sequences. A subset of 27 sequences representing the whole evolutionary diversity of eukaryotes was therefore selected (Table 2) and evolutionary relationships between these sequences were inferred using the fastDNAmI maximum likelihood method (Olsen et al. 1994) on 872 gap-free, reliably aligned sequence sites. The alignment file is available from authors upon request. Program fastDNAmI was run with a tran-

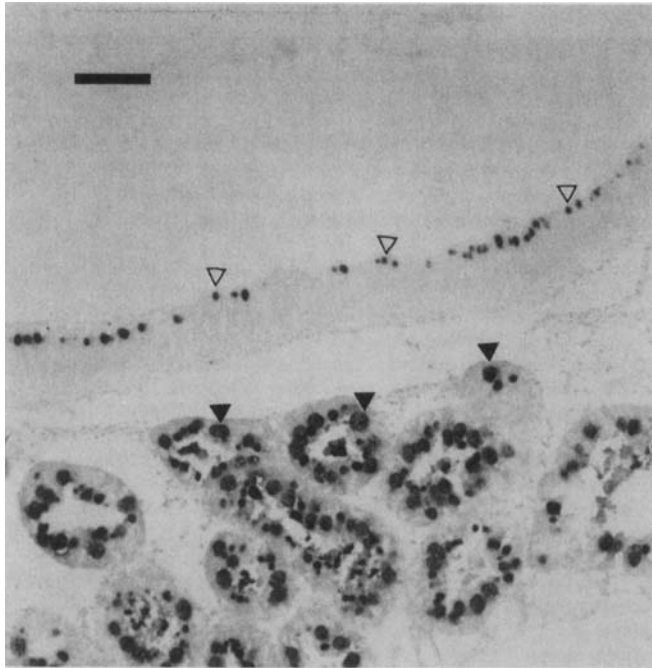


Fig. 1. Detection of *Marteilia refringens* by in situ hybridization in tissues of the mussel, *Mytilus edulis*. *Marteilia refringens* cells may be observed within the epithelia of the intestine (sporangia primordia, unshaded arrow) and digestive tubules (sporangia, shaded arrow). The bar represents 150 μm .

sition/transversion ratio of 3, branch swapping to depth 3, and 10 randomly chosen sequence input orders. The tree was rooted on the microsporidian branch following Leipe et al. (1993). Statistical evaluation of phylogenetic groupings was performed by applying the bootstrap method to Neighbor Joining trees obtained from Kimura's two-parameter distances (Li, 1997).

RESULTS

The SSU rRNA gene sequence of *Marteilia* sp. isolated from *M. edulis* is 2302 nucleotides in length. The sequence of nearly the whole SSU rRNA of *Marteilia refringens* isolated from *O. edulis* obtained using primers SS1 and CAS2 was shown to be identical to its counterpart isolated from *M. edulis*.

Alignment of this sequence with homologous sequences of 50 eukaryotic species, including other mollusc protozoans, showed that the sequence from *M. refringens* contains highly divergent regions. These regions were used to design a specific probe. In situ hybridization experiments with this probe produced strong reactions with *M. refringens* sporangia and sporangia primordia (Fig. 1), but no reaction with host cells. Furthermore, the probe was used in in situ hybridizations of sections from oysters infected with *Bonamia* or *Marteilioides* and from uninfected mussels and oysters, and this did not lead to any signal (data not shown).

Phylogenetic relationships between the SSU rDNA sequence of *M. refringens* and 26 homologous eukaryotic sequences were inferred by the maximum likelihood method (Fig. 2). The *M. refringens* sequence does not appear closely related to the sequences of any phylum. The bootstrap support for the branch that separates *M. refringens*, diplomonads, parabasalids, and microsporidia from all other eukaryotes was 99% out of 1000 replicates.

DISCUSSION

During the last thirty years, *Marteilia* spp. have been the main etiological agents to destroy a large part of cultured molluscs in Europe and Australia. Control of marteliosis requires knowledge of the taxonomy of *Marteilia* spp. in relation to their various host species. In Europe, *M. refringens* has been described in various bivalve species, *O. edulis* (Grizel et al. 1974), *M. edulis* (Tigé and Rabouin 1976), and *M. galloprovincialis* (Villalba et al. 1993). On the other hand, *M. maurini* has been described in *M. galloprovincialis* (Comps, Grizel, and Papayanni 1982) and *M. edulis* (Auffret and Poder 1983). Unidentified *Marteilia* spp. have also been observed in cockles *Cardium edule* (Comps et al. 1975), clams, *Tapes rhomboides* (Poder, Auffret, and Balouet 1983), *Tapes pullastra* (Figueras, Robledo, and Novoa 1996), and mussels, *Modiolus modiolus* (Auffret and Poder 1987), *M. edulis* (Comps et al. 1975), and *M. galloprovincialis* (Ceschia et al. 1992). There is, therefore, a clear need for better understanding the taxonomy of *Marteilia* spp. and their host specificities.

The present results show that both *O. edulis* and *M. edulis* are hosts of *M. refringens*. This agrees with the observations of Tigé and Rabouin (1976) and Auffret and Poder (1983) and confirms the opinion of Longshaw (pers. commun.) that in *M. edulis* discrimination between *M. maurini* and *M. refringens* is probably not justified. Further work will be directed in sequencing the SSU rDNA of various isolates from different locations and mollusc species in Europe. *Marteilia* isolates originating from the North Adriatic would be especially interesting, considering that *M. maurini* was described in *M. galloprovincialis* originating from this area (Comps, Grizel, and Papayanni 1982).

One of the goals of this study was the clarification of the controversial taxonomy of paramyxean parasites. Phylogenetic analysis of the sequence of the SSU rDNA gene of *Marteilia* sp. (Fig. 2) indicates that *M. refringens* is not closely related to any single eukaryotic phylum. Moreover, the SSU rDNA sequence of *M. refringens* is not related to those of Myxosporidia, which have been recognized as highly derived cnidarians (Siddall et al. 1995) nor to the haplosporidians *Haplosporidium* and *Urosporidium*. Our phylogenetic analysis of this sequence suggests that Paramyxia should stand as a eukaryotic phylum, as suggested by Desportes and Perkins (1990) (Table 1), and strongly refutes the classification of *M. refringens* with either myxosporidians or haplosporidians.

Our phylogenetic analysis of SSU rDNA sequences indicates an early evolutionary origin of Paramyxia. There is, however, increasing evidence that the basal topology drawn from SSU rDNA analysis may be an artifact of variation in the rate of molecular evolution among eukaryotic taxa (Peyretailade et al. 1998; Stiller and Hall 1999). Early-emerging lineages may have evolved much faster than did most other eukaryotes, as is often found with parasitic organisms. Such high evolutionary rates make extremely uncertain identifying which organisms are most closely related to Paramyxia. In comparable situations, such as with microsporidia, sequencing of other genes of phylogenetic interest proved very valuable to determine their evolutionary origin (Hirt et al. 1999 and references therein). Therefore, similar work should be undertaken with Paramyxia.

Because the preparation of parasite cells cannot be expected to be free of any host or other protist's cells, it is essential to confirm the identity of the PCR-amplified sequence obtained. In situ hybridization experiments were carried out using a probe designed from variable regions of the SSU rDNA sequence. These experiments resulted in strong positive reactions with *M. refringens* and no reaction from host tissues. Moreover, the

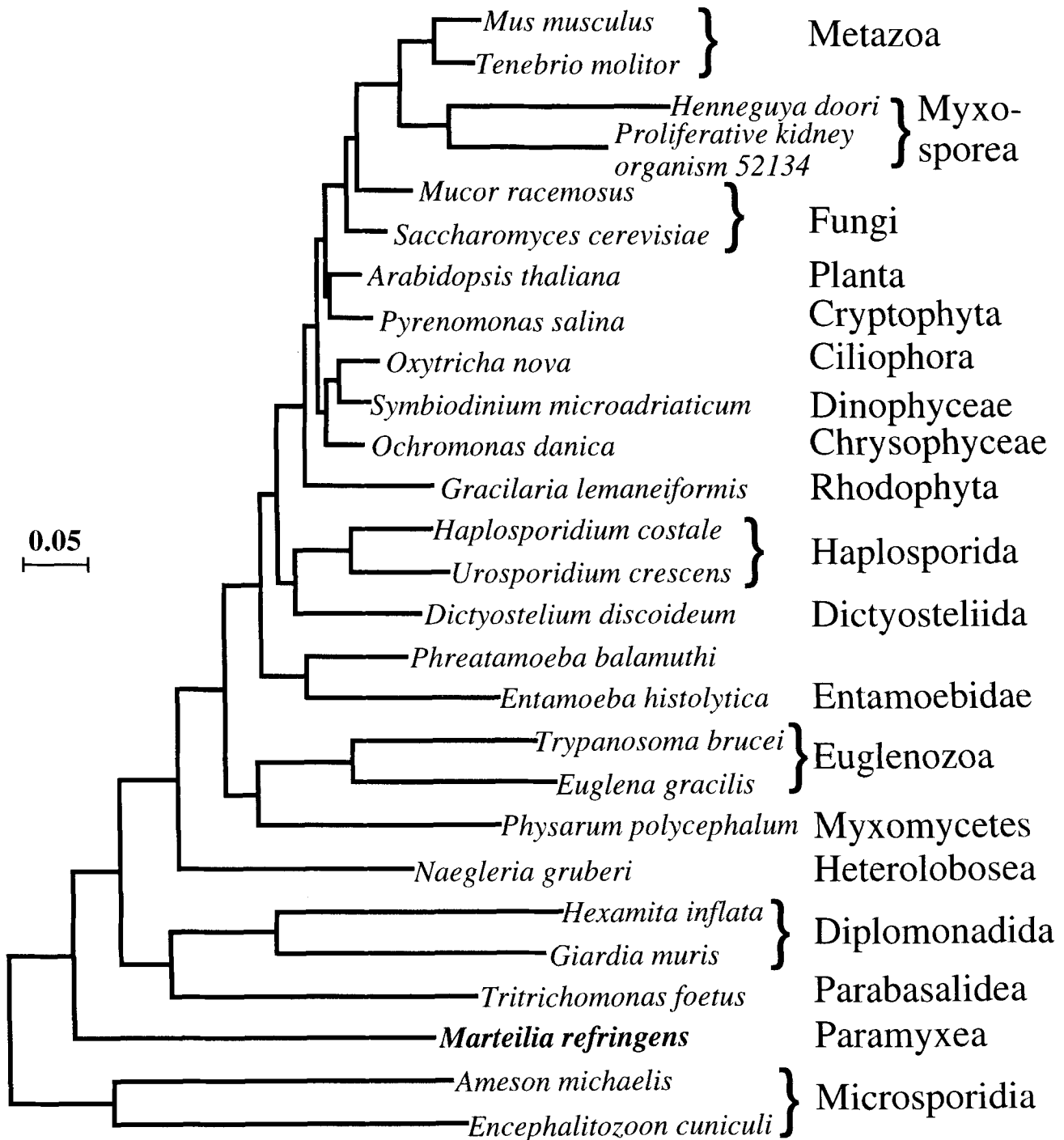


Fig. 2. Phylogenetic relationship of *Marteilia refringens* to 26 representative eukaryotes inferred by maximum likelihood analysis of small subunit ribosomal DNA sequences. The tree is rooted on the microsporidian lineage, following Leipe et al. (1993).

same probe was used to successfully detect the SSU rDNA transcript of the parasite by Northern blot with RNA extracted from purified *M. refringens* cells (Le Roux et al. 1999). Finally, the set of SSU rDNA sequences used to define the probe included sequences from several parasites, ensuring that the probe was not expected to cross-hybridize with these organisms. All these results confirm that the obtained sequence is indeed from *M. refringens*.

A consequence of this work is the development of specific

probes, which should be useful as detection tools. These probes should be useful to determine the transmission route of *M. refringens* and therefore its life-cycle, which is currently unknown. Experimental observations suggest that intermediate or alternative hosts or free-living stages are essential in the life-cycle of this parasite (Berthe et al. 1998). The detection of these intermediate stages of *M. refringens* could be achieved by PCR and in situ hybridization in further life-cycle investigations.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially funded by the EU DG XIV (contract FAIR CT: PL97-3640) and the EU DG VI through the Community Reference Laboratory for Mollusc Diseases, Ifremer, La Tremblade. The authors also wish to acknowledge Ms M. Bonnet and Dr T. Renault for their kind technical assistance and G. Méténier for comments on the manuscript.

LITERATURE CITED

- Adlard, R. D. & Ernst, I. 1995. Extended range of the oyster pathogen *Marteilia sydneyi*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **15**:119–121.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**:403–410.
- Auffret, M. & Poder, M. 1983. Recherches sur *Marteilia maurini*, parasite de *Mytilus edulis* sur les côtes de Bretagne nord. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **47**: 105–109.
- Auffret, M. & Poder, M. 1987. Pathology of the main bivalve mollusc species from oyster rearing areas in Brittany (France). *Aquaculture*, **67**:255–257.
- Berthe, F. C. J., Pernas, M., Zerabib, M., Haffner, P., Thébault, A. & Figueras, A. J. 1998. Experimental transmission of *Marteilia refringens* with special considerations for its life cycle. *Dis. Aquat. Org.*, **34**:135–144.
- Ceschia, G., Mion, A., Orel, G. & Giorgetti, G. 1992. Indagine parasitologica delle mitilicoltura del Friuli-Venezia Giulia (Nord-Est Italia). *Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica.*, **9**:24–36.
- Chatton, E. 1911. Sur une Cnidosporidie sans cnidoblaste (*Paramyxa paradoxa*, n. g., n. sp.). *C. R. Acad. Sci. Paris*, **152**:631–633.
- Comps, M. 1970. Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates (*Ostrea edulis* L.) dans le Bassin de Marennes. *Proc. ICES*, **K**:4.
- Comps, M., Grizel, H. & Papayanni, Y. 1982. Infection parasitaire causée par *Marteilia maurini* sp. nov. chez la moule *Mytilus galloprovincialis*. *Proc. ICES*, **F**:1–3.
- 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*, **22**:279–285.
- Comps, M., Grizel, H., Tigé, G. & Duthoit, J. L. 1975. Parasites nouveaux de la glande digestive des mollusques marins *Mytilus edulis* L. et *Cardium edule*. *C.R. Acad. Sci. Paris, Série D.*, **281**:179–181.
- Corliss, J. O. 1984. The kingdom Protista and its 45 phyla. *Biosystems*, **17**:87–126.
- Desportes, I. 1984. The *Paramyxa* Levine, 1979: an original example of evolution towards multicellularity. *Origins of Life*, **13**:343–352.
- Desportes, I. & Ginsburger-Vogel, T. 1977. Affinités du genre *Marteilia*, parasite d'huîtres (maladie des Abers) et du Crustacé *Orchestia gammarellus* (Pallas), avec les Myxosporidies, Actinomyxidies et Paramyxidies. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **285**:1111–1114.
- Desportes, I. & Lom, J. 1981. Affinités de *Paramyxa paradoxa* Chatton 1911, parasite de *Poecilochaetus serpens* (Annélide Polychète) avec les Marteiliidae Sprague, parasites d'huîtres et du Crustacé *Orchestia gammarellus*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **292**:627–632.
- Desportes, I. & Perkins, F. O. 1990. Phylum Paramyxea. In: Margulis, L.; Corliss, J. O.; Melkonian, M. & Chapman, D. J. (ed.), *Handbook of Protozoa*. Jones & Bartlett Publ., Boston. p. 30–35.
- Figueras, A. J. & Montes, J. 1988. Aber disease of edible oysters caused by *Marteilia refringens*. *Amer. Fisheries Soc. Spec. Publ.*, **18**:38–46.
- Figueras, A. J., Robledo, J. A. F. & Novoa, B. 1996. Brown ring disease and parasites in clams (*Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum*) from Spain and Portugal. *J. Shellfish Res.*, **15**:363–368.
- Fuentes, J., Villalba, A., Zapata, C. & Alvarez, G. 1995. Effects of stock and culture environment on infections by *Marteilia refringens* and *Mytilicola intestinalis* in the mussel *Mytilus galloprovincialis* cultured in Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Org.*, **21**:221–226.
- Ginsburger-Vogel, T. & Desportes, I. 1979. Etude ultrastructurale de la sporulation de *Paramarteilia orchestiae* gen. n. sp. n. parasite de l'amphipode *Orchestia gammarellus* Pallas. *Protistologica*, **26**:390–403.
- Grizel, H. & Tigé, G. 1977. Observations sur le cycle de *Marteilia refringens*. *Haliotis*, **8**:327–330.
- 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. *Sci. Pêche. Bull. Inst. Pêches Marit.*, **240**:7–29.
- Herrbach, B. 1971. Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate, *Ostrea edulis* Linné. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, **35**: 79–87.
- Hirt, R. P., Logsdon, J. M., Healy, B., Dorey, M. W., Doolittle, W. F. & Embley, T. M. 1999. Microsporidia are related to fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**:580–585.
- Leipe, D. D., Gunderson, J. H., Nerad, T. A. & Sogin, M. L. 1993. Small subunit ribosomal RNA of *Hexamita inflata* and the quest for the first branch in the eukaryotic tree. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **59**: 41–48.
- Le Roux, F., Audemard, C., Barnaud, A. & Berthe, F. 1999. DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia*. *Marine Biotechnology*, **1**:588–597.
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich III, A. R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F. C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. & Wallace, F. G. 1980. A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.*, **27**:37–58.
- Li, W. H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer, Inc., Sunderland, MA.
- Maidak, B. L., Olsen, G. J., Larsen, N., Overbeek, R., McCaughey, M. J. & Woese, C. R. 1997. The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.*, **25**:109–111.
- Medlin, L., Elwood, H. J., Stickel, S. & Sogin, M. L. 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, **71**:491–499.
- Miahle, E., Bachere, E., LeBec, C. & Grizel, H. 1985. Isolement et purification de *Marteilia* (Protozoa: Asctospora) parasites de bivalves marins. *C. R. Acad. Sci. Paris, Série III*, **301**:137–142.
- Olsen, G. J., Matsuda, H., Hagstrom, R. & Overbeek, R. 1994. fast-DNAml: a tool for construction of phylogenetic trees of DNA sequences using maximum likelihood. *Computer Applic. Biosci.*, **10**: 41–48.
- Perkins, F. O. 1976. Ultrastructure of sporulation in the European flat oyster pathogen *Marteilia refringens*—taxonomic implications. *J. Protozool.*, **23**:64–74.
- Perkins, F. O. & Wolf, P. H. 1976. Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp. n.—Haplosporidian pathogen of Australian oysters. *J. Parasit.*, **62**:528–538.
- Peyretailade, E., Biderre, C., Peyret, P., Duffieux, F., Méténier, G., Gouy, M., Michot, B. & Vivarès, C. P. 1998. Microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*, a unicellular eukaryote with an unusual chromosomal dispersion of ribosomal genes and a LSU rRNA reduced to the universal core. *Nucleic Acids Res.*, **26**:3513–3520.
- Poder, M., Auffret, M. & Balouet, G. 1983. Etudes pathologiques et épidémiologiques des lésions parasitaires chez *Ostrea edulis* L.—Premiers résultats d'une recherche prospective comparative chez les principales espèces de mollusques des zones ostréicoles de Bretagne nord. *Proc. Colloq. Bases Biol. Aquacult.*, CNRS-CNEXO, Montpellier. p. 125–138.
- Robert, R., Borel, M., Pichot, Y. & Trut, G. 1991. Growth and mortality of the European oyster *Ostrea edulis* in the Bay of Arcachon (France). *Aquat. Liv. Resour.*, **4**:265–274.
- Robledo, J. A. F., Mialhe, E. & Figueras, A. J. 1995. Purification of several phases of the parasite *Marteilia* (Protozoa: *Asctospora*) from mussels (*Mytilus galloprovincialis*). In: Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Smith, S. A., Zelikoff, J. T., Kaatari, S. L., Anderson, R. S., Soderholl, K. & Weeks-Perkins, B. A. (ed.), *Techniques in Fish Immunology*. Chp.4. Immunology and Pathology of Aquatic Invertebrates. Stolen, SOS Publ., Fair Haven, NJ. p:117–121.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**:5463–5467.
- Shyamala, V. & Ames, G. F.-L. 1993. Genome walking by single specific primer-polymerase chain reaction (SSP-PCR). *Methods Enzymol.*, **217**:436–446.
- Siddall, M. E., Martin, D. S., Bridge, D., Desser, S. S. & Cone, D. K. 1995. The demise of a phylum of protists: phylogeny of Myxozoa and other parasitic cnidaria. *J. Parasitol.*, **81**:961–967.
- Sprague, V. 1979. Classification of the Haplosporidia. *Mar. Fish. Rev.*, **41**:40–44.

- Staden, R. 1996. The Staden sequence analysis package. *Mol. Biotechnol.*, **5**:233–241.
- Stiller, J. W. & Hall, B. D. 1999. Long-branch attraction and the rDNA model of early eukaryotic evolution. *Mol. Biol. Evol.*, **16**:1270–1279
- Tigé, G. & Rabouin, M. A. 1976. Etude d'un lot de moules transférées dans un centre touché par l'épizootie affectant l'huître plate. *Proc. ICES*, **K**:1–10.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.*, **22**:4673–468
- Villalba, A., Mourelle, S. G., Lopez, M. C., Carballal, M. J. & Azevedo, C. 1993. Marteiliasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW Spain). I. Etiology, phases of the infection, and temporal and spatial variability in prevalence. *Dis. Aquat. Org.*, **16**:61–72.
- Vossbrinck, C. R., Baker, M. D., Didier, E. S., Debrunner-Vossbrinck, B. A. & Shaddock, J. A. 1993. Ribosomal DNA sequences of *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon cuniculi*: species identification and phylogenetic construction. *J. Eukaryot. (Euk.) Microbiol.*, **40**:354–362.

Received: 06-2-99, 11-15-99, 01-13-00; accepted 01-13-00

Article 9 : Le Roux & al., 2001

Molecular Evidence for the Existence of Two Species of *Marteilia* in Europe

FREDERIQUE LE ROUX,^a GEMA LORENZO,^b PIERRE PEYRET,^c CORINNE AUDEMARD,^a ANTONIO FIGUERAS,^b
CHRISTIAN VIVARÈS,^c MANOLO GOUY^d and FRANCK BERTHE^a

^aLaboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER, BP133 Ronce-Les-Bains, 17390 La Tremblade, France, and

^bInstituto Investigaciones Marinas. CSIC.Eduardo Cabello 6, 36208 Vigo, Spain, and

^cLaboratoire de Protistologie moléculaire et cellulaire des parasites opportunistes, LBCEP, UPRESA CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière, France, and

^dLaboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, UMR CNRS 5558, Université Claude Bernard-Lyon 1, 43 Bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France

ABSTRACT. *Marteilia refringens* is one of the most significant pathogens of bivalve molluscs. Previous sequencing of the small subunit ribosomal RNA gene of *M. refringens* isolates derived from the infected mussels (*Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*) and the oyster (*Ostrea edulis*) in Europe did not reveal genetic polymorphisms despite indications from epizootiological data that distinct types may exist. We investigated the existence of polymorphisms in the internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA genes. The sequences of this region proved to be clearly dimorphic among *Marteilia* from five sampling sites. The distribution of the two genetic types, named "O" and "M", appeared to be linked to the host species, oysters and mussels, respectively. We therefore support the recognition of two species of *Marteilia* in Europe and propose that the "O" type corresponds to *M. refringens* and the "M" type to *M. maurini*.

Key Words. Dimorphism, genetic differentiation, host/parasite relationships, internal transcribed spacer.

PARAMYXEANS, a group of protistan parasites that infect marine invertebrates, are characterised by the formation of spores. These spores consist of several cells, enclosed inside one another, which result from internal cleavage of a stem cell (Desportes and Perkins 1990). In the phylum Paramyxea, species of the genus *Marteilia* have been extensively studied due to their detrimental effect on commercially exploited bivalves. *Marteilia refringens*, the aetiological agent of "Abers Disease" (Figuera and Montes 1988; Grizel et al. 1974), has caused mass mortalities in the European flat oyster, *Ostrea edulis* (Alderman 1979; Robert et al. 1991). A related organism, *Marteilia sydneyi*, has been responsible for mass mortalities of *Crassostrea glomerata* (*Saccostrea commercialis*) in Australia (Adlard and Ernst 1995; Perkins and Wolf 1976). *Marteilia refringens* and *M. sydneyi* have thus been recognised by the World Organisation for Animal Health as significant pathogens of bivalve molluscs (O.I.E Code 2000). The identification of these two species can easily be made by classical histological methods, since they have different numbers of secondary and tertiary cells in the characteristic cell-within-cell structure (Perkins 1976; Perkins and Wolf 1976).

In Europe, *Marteilia refringens* has been detected in the oyster *Ostrea edulis* (Grizel et al. 1974) and the mussels *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* (Tigé and Rabouin 1976; Villalba et al. 1993b). Another species of the genus *Marteilia*, *M. maurini*, was described in *M. galloprovincialis* from Venice Lagoon, Italy (Comps et al. 1982). Later, this species was also described as parasitizing *M. edulis* in France (Auffret and Pöder 1983). The differential diagnosis of these two main European species of *Marteilia* (*M. refringens* and *M. maurini*) is based on ultrastructural characteristics and host specificity (Comps et al. 1982; Figueras and Montes 1988; Grizel et al. 1974; Perkins 1976). In a recent study, the small subunit ribosomal genes (SSU rRNA) of *M. refringens* purified from infected mussels (*M. edulis*) and oysters (*O. edulis*), were sequenced and shown to be identical (Berthe et al. 2000). *Marteilia maurini* was first described in mussels originating from the Adriatic Sea (Comps et al. 1982). Therefore *M. maurini* could be truly indigenous to a geographic area, similarly it could also apply specifically to *M. galloprovincialis*. To answer this question, the SSU rDNA gene of *Marteilia* sp. infecting *M. galloprovincialis* from the Adriatic Sea and from the Atlantic coast has been sequenced

and shown to be identical (Le Roux, F., unpubl. data). These results showed that, on the basis of the SSU rDNA gene, it is impossible to discriminate the *Marteilia* sp. recovered from oysters and mussels in Europe.

However, field studies and descriptive epizootiology strongly suggest that distinct types of *M. refringens* infect bivalve molluscs in Europe. Mass mortality outbreaks, first detected in flat oysters (Alderman 1979; Balouet et al. 1979; Berthe et al. 1998; Grizel 1985) and attributed to *M. refringens* infections, have seldom been reported in mussels. Although Robledo and Figueras (1995) described specific tissue responses in association with the different stages of infection in *M. galloprovincialis* infected with *M. refringens* and Villalba et al. (1993a) suggested a detrimental effect of *M. refringens* on the development of mussel gonads, the association between mortality of mussels and infection by *M. refringens*, has remained controversial (Robledo and Figueras 1995; Villalba et al. 1997).

The geographic distribution of *Marteilia refringens* provides further evidence suggesting the existence of distinct types of the parasite. In areas where mussels are infected, the parasite is usually not detected in oysters (Figueras and Robledo, 1993; Zncric et al., pers. commun.), while, in areas where oysters are infected, mussels are usually not (Thebault, A., pers. commun.).

Parasites identical in morphology and SSU rDNA nucleotide sequences can have different specificities for the host and even different pathogenicities (Hide and Tait 1991). A molecular probe targeting less conserved region may allow discrimination between different species, subspecies or strains. The first internal transcribed spacer (ITS-1) of the rRNA gene cluster is known to evolve faster than SSU rDNA. Previous studies of polymorphisms in this segment have helped to clarify the relationships between parasites (Hide and Tait 1991). Here we demonstrate the genetic differentiation of two clusters of European isolates of *M. refringens*, using ITS-1 sequences as markers.

MATERIALS AND METHODS

Sampling. Naturally infected mussels *Mytilus* spp. and oysters *Ostrea edulis* were collected from different geographic areas (Fig. 1). Prior to DNA extraction, infection was individually checked by means of digestive gland imprints stained with a modified Giemsa staining method (Hemacolor kit, Merck, Darmstadt, Germany).

DNA extraction. Infected animals were frozen at -80°C and the tissues were ground to powder. Around 10 vols. of extraction buffer (NaCl 100 mM, EDTA 25 mM, pH 8, 0.5%

Corresponding Author: F. Le Roux—Telephone number: 33 5 46 36 98 36; Fax number: 33 5 46 36 37 52; E-mail: fleroux@ifremer.fr

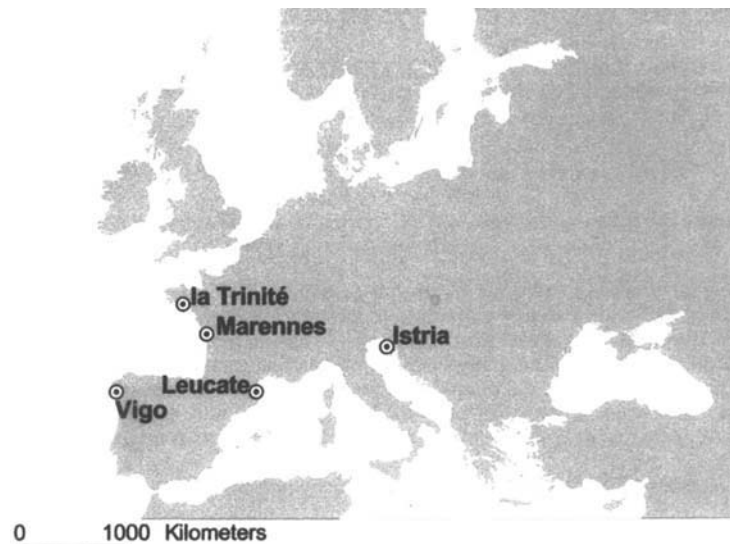


Fig. 1. Geographic areas where mussels and oysters naturally infected with *Marteilia refringens*, were collected.

SDS) were added with proteinase K (100 µg/ml). Following an overnight incubation at 50 °C, DNA was extracted using a standard phenol/chloroform protocol, and precipitated with ethanol.

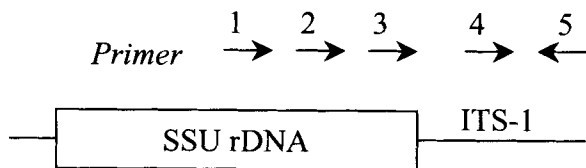
DNA amplification, cloning and sequencing. A 2,643-bp amplification product that contained the SSU rDNA gene and a part of the ITS-1 was obtained using a modified single-specific primer PCR (SSP-PCR) technique in a previous study (Berthe et al. 2000). Five primers were designed and used to amplify different segments of this parent DNA template (Fig. 2). PCR were carried out in 50 µl according to the standard conditions for Silver-star *Taq* DNA polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgium). After denaturation of DNA at 94 °C for 5

min, 30 cycles were run with an MJ-Research thermocycler (Polylabo, Strasbourg, France) as follows: denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 1 min, and elongation at 72 °C for 1 min per kbp. A final elongation step of 10 min at 72 °C was performed. Amplified products were analyzed electrophoretically on 1% agarose gels and cloned using the pCR 2.1 Vector System (Invitrogen, Groningen, Netherlands). Minipreps of recombinant plasmids were prepared according to standard alkaline lysis protocols with an additional phenol/chloroform extraction step and ethanol precipitation. Nucleotide sequences were determined by the Sanger method (Sanger et al. 1977), using an ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing kit according to the manufacturer's recommendations (Perkin-Elmer, Boston, USA). Thermocycling of the sequencing reactions and electrophoresis were carried out on a Gene Amp PCR system 2400 and the products were analysed on an ABI Prism 377 Sequencer (Perkin-Elmer). Sequences were edited using the Staden package (Staden 1996).

To study the size of the ITS-1 5'-region of *M. refringens* from infected mussels and oysters, two primer pairs, 1 + 5 and 2 + 5, were used in PCR with template DNA extracted from infected mussels and oysters (Fig. 3). To investigate polymorphisms within the ITS-1, PCR were performed using primers 3 + 5 and template DNA extracted from 2 infected mussels or oysters. The resulting PCR products were cloned and for each template the inserts in two recombinant constructs were sequenced.

To study the variability of *M. refringens* from 5 different geographic zones, PCR were performed using primers 4 + 5 with template DNA extracted from 10 infected animals (two from each geographic area, Fig. 1). The PCR products were cloned and for each animal several (2 to 4) clones were selected for sequencing. DNA from uninfected animals was also tested and always proved to be negative by PCR.

Restriction fragment length polymorphisms (RFLP). PCR was performed with primers (4 + 5) and template DNA from infected animals from the different geographic areas or recombinant plasmids (20 cloned amplicons for each of the two animals with mixed profiles), in order to evaluate the profile of the different types and coinfection with both types. Polymorphisms among the PCR products were identified by testing for cleavage



Sequence of primer

Pr1: 5'-GGAATTGACGGAAGGGCACC-3'

Pr2: 5'-CCCTGCGCAATTTGCGTTCG-3'

Pr3: 5'-CAGACTGCACTTCGGTGCGG-3'

Pr4: 5'-CCGCACACGTTCTTCACTCC-3'

Pr5: 5'-CTCGCGAGTTTCGACAGACG-3'

Fig. 2. Primer annealing sites on the SSU rRNA gene and ITS-1 region. The sequences and orientations of the primers are also indicated.

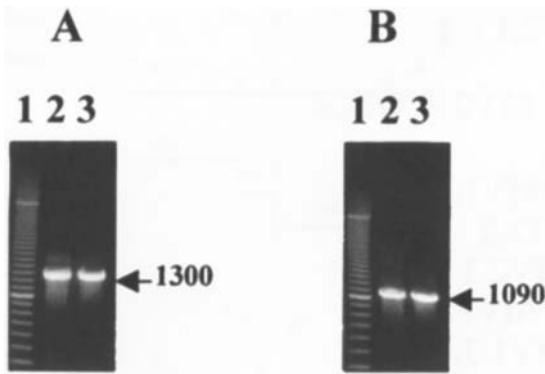


Fig. 3. PCR amplification of the SSU rRNA gene and ITS-1 region using the primer pairs. The predicted sizes of the PCR products detected on an ethidium bromide-stained gel, were 1300-bp for primer pair 1 + 5 (A) and 1090-bp for primer pair 2 + 5 (B). Two templates were tested by PCR: lane 2 *Marteilia refringens* from infected *Mytilus edulis*, lane 3, *Marteilia refringens* from infected *Ostrea edulis*. The molecular weight marker is a 100-bp ladder (lane 1).

with *HhaI* (Promega). The resulting restriction fragments were analyzed electrophoretically on 2% agarose gels.

Phylogenetic analysis. Forty-four representative sequences were aligned and phylogenetic analyses were performed using Seaview and Phylo-win programs (Galtier et al. 1996). The phylogenetic tree was built using the neighbour-joining method (Saitou and Nei 1987). Reliability of the topology was assessed by the bootstrap method with 1,000 replicates.

RESULTS

The ITS-1 segment amplified in PCR using template DNA from *Marteilia refringens* infecting mussels and oysters. Using primer pairs 1 + 5 and 2 + 5, DNA products of 1.3 kb and 1.09 kb, respectively, were amplified from template DNA extracted from infected mussels or oysters (Fig. 3). This indicated that no significant polymorphism in size could be detected using PCR amplification of this DNA region.

Assessment of a polymorphic region in the ITS-1. The segment flanked by primers 4 and 5 in the ITS-1 region was shown to be polymorphic (Fig. 4). In particular, the sequences could be divided into two major groups on the basis of mutations at nucleotide positions indicated by an asterisk in Fig. 4. In contrast, the segment flanked by primers 3 and 4 was not found to be polymorphic (data not shown).

Dimorphism of *Marteilia refringens*. Sequences of the polymorphic region indicated the existence of two genetically distinct groups within *Marteilia refringens* (Fig. 5) supported by a bootstrap value of 98%. The sequences defining the upper group (M) were derived mostly from mussels whereas those representing the lower group (O) were derived mostly from oysters. This led us to define two types of *M. refringens* the "M type" and the "O type".

Linkage of dimorphism to host. By analysing the O type and M type sequences for restriction sites, a type-specific polymorphism (Fig. 6) was identified at one of three *HhaI* cleavage sites detected at positions 156, 187, and 344 in M type sequences (see Fig. 4). An analysis of PCR products with this restriction enzyme is given in Fig. 7. Undigested amplicon obtained with primer pair (4 + 5) gave a band of 412-bp for infected mussels (lane 2) or 413-bp for infected oysters. As depicted in Fig. 7, the O type profile (lane 3) consisted of two restriction fragments of 226-bp and 156-bp, respectively. The M type profile (lane 4) lacked the 226-bp fragment because of an additional *HhaI*

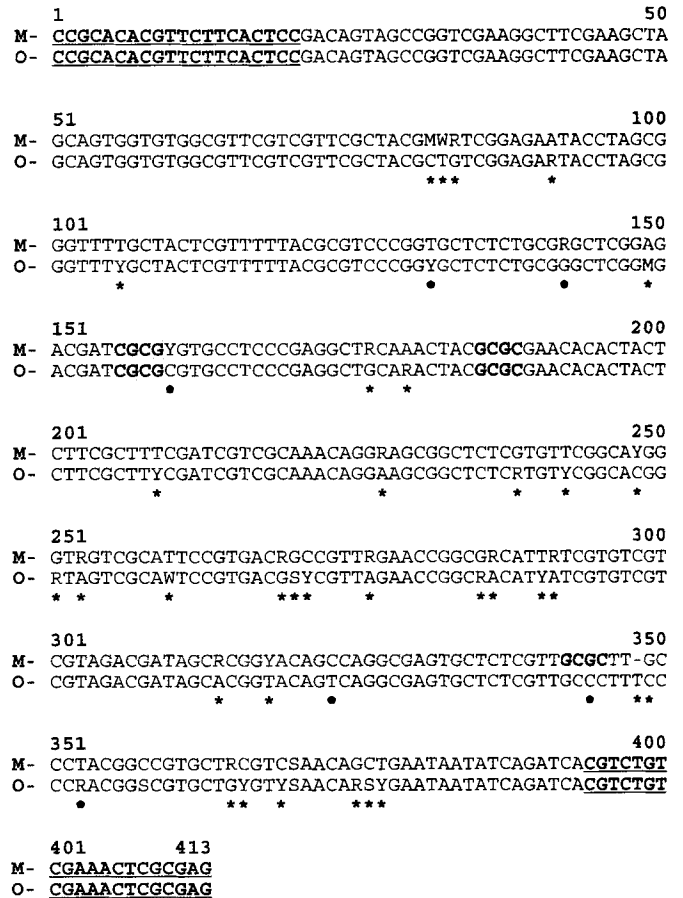


Fig. 4. Aligned nucleotide sequences of cloned ITS-1 segments amplified from *Marteilia refringens* DNA using primer pair 4 + 5. Primers are bold and underlined. *HhaI* restriction sites are in grey boxes. Differences between the two types are indicated by asterisks. The M type sequence has been obtained by comparisons of 19 sequences from this type and the O type sequence has been obtained by comparisons of 25 sequences. Intra-type polymorphisms are indicated by: R: A/G; M: C/A; W: A/T; Y: C/T; S: C/G).

site within this fragment but was characterized by two fragments of 157- and 68-bp (see Fig. 6). The 156- and 157-bp band seemed to consist of two identically-sized fragments (156-bp, from both O type and M type and 157-bp, from M type sequence only). The shorter (31-bp) DNA fragments, produced by cleavage of both O type and M type DNA at *HhaI* sites 156 and 187 (Fig. 6), could not be visualised due to their small size.

HhaI-RFLP analysis was performed on the PCR products obtained from a total of 77 animals originating from 5 different locations in Europe. In four out of five areas, we detected the parasite only in one host species, mussel or oyster (Table 1). Among infected animals, the M type was always detected in mussels and the O type was always detected in oysters. However, in the area of La Trinité both species of bivalves were infected. In this area, similar PCR RFLP results were obtained: the M type profile was almost exclusively in mussels and the O type profile was almost exclusively in oysters. However, 1 out of 15 infected mussels and 1 out of 20 infected oysters exhibited a third profile (lane 5, Fig. 7). This profile can be explained by coinfection of the same animal by parasites of the O and M types, or (less likely) by the existence of a third *M. refringens* type.

Coinfection. In the case of the mussel presenting the third

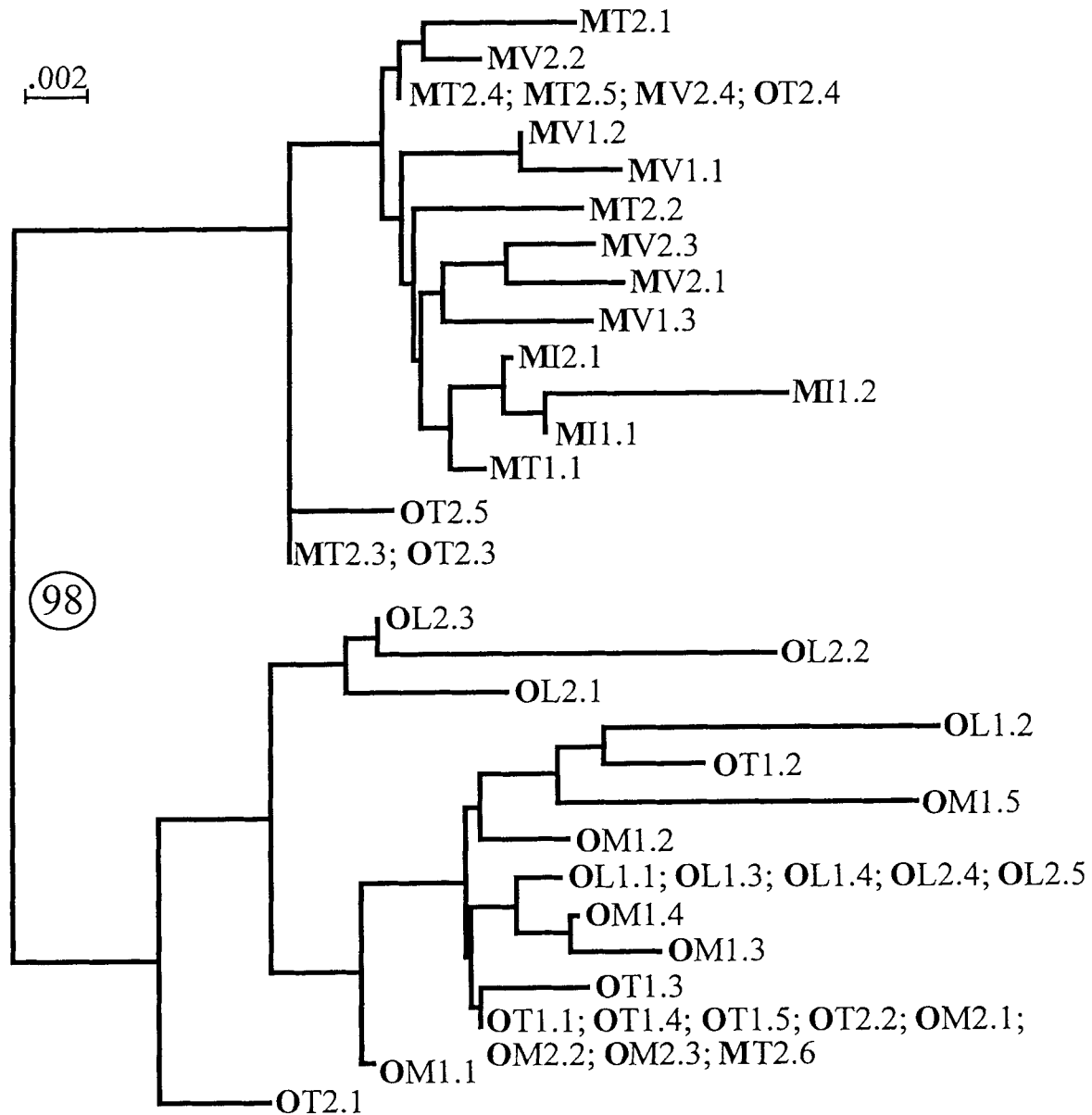


Fig. 5. Inferred phylogenetic relationships between 44 partial ITS-1 sequences of *Marteilia refringens* derived by PCR amplification from 10 samples. Sequence names indicate host (O, oyster; M, mussel), geographic origin (T, La Trinité; M, Mareennes; V, Vigo; L, Leucate; I, Istria), number of sampled animal, and finally clone number. Multiple names indicate identical sequences. Horizontal branch lengths are proportional to sequence divergence expressed in substitutions/site computed from 301 gap-free homologous sites. The bootstrap value supporting the two main clusters is circled; all other bootstrap values were < 90%.

profile, two clones out of 20 were type O and 18 were M type (data not shown). In the case of the oyster, 6 clones out of 20 were M type and 14 O type. When some of these clones were sequenced (OT2.3, OT2.4, OT2.5, MT2.6), their phylogenetic positions clearly rule out the third-type hypothesis (Fig. 5) and confirmed that these animals were coinfecting by both O and M type organisms.

DISCUSSION

In Europe, *Marteilia refringens* has been observed in different species of oysters and mussels. The existence of a second species within the genus, *Marteilia maurini*, was proposed based on ultrastructural criteria and host specificity (Comps et al. 1982; Grizel et al. 1974). However, doubts have persisted

regarding the reliability of these morphological criteria for species identification since parasite morphology might be affected by host. In addition, epizootiological data suggested that there are distinct types of *M. refringens* in Europe (Alderman 1979; Balouet et al. 1979; Berthe et al. 1998; Figueras and Robledo 1993; Grizel 1985; Robledo and Figueras 1995; Villalba et al. 1997).

In a recent study, we showed that the sequence of SSU rDNA does not allow discrimination between European *Marteilia* sp. isolates from infected *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis*, and *Mytilus galloprovincialis* (Berthe et al. 2000). We have now demonstrated genetic differentiation between European isolates of *M. refringens*.

The ITS-1 region sequences for parasites originating from

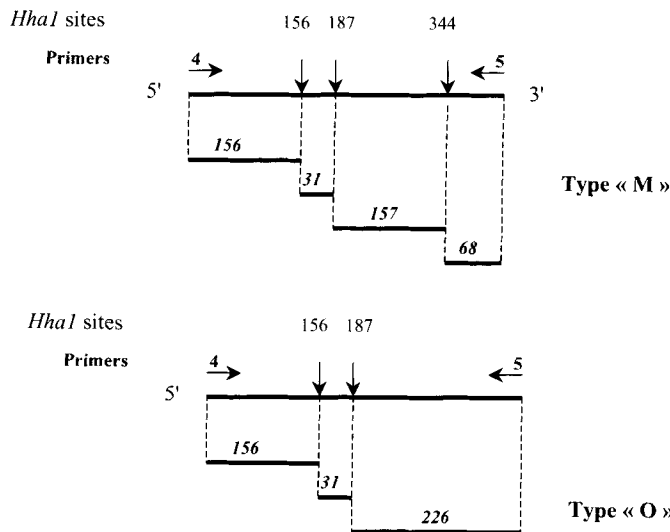


Fig. 6. Restriction site analysis of the amplicons flanked by primers 4 and 5 for the M type and O type of *Marteilia refringens*.

the five sampled sites, were shown to be polymorphic. Phylogenetic analysis of the 44 sequences obtained gave three results (Fig. 5). First, *M. refringens* isolates are unambiguously divided into two clusters. Second, no further division in subgroups is possible given available data. Third, the two clusters are strongly related to the host species of the parasites. We therefore propose the existence of two types of *Marteilia refringens* and define an "O" type (*M. refringens* from *Ostrea edulis*) and a "M" type (*M. refringens* from *Mytilus* spp.). These phylogenetic results were confirmed by PCR-RFLP in which the O type was always detected in oysters and the M type in mussels (Table 1).

This dimorphism between the two types suggests a functional divergence that could consist of differences in life cycle, host

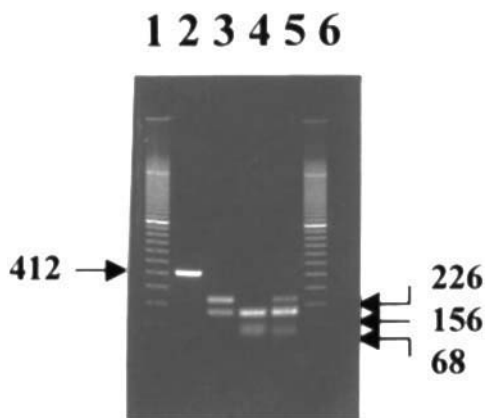


Fig. 7. Detection of a polymorphism involving an *HhaI* restriction site in *Marteilia refringens* DNA. DNA from *M. refringens* amplified with primers 4 + 5 yielded amplicons of 412-bp when from infected mussel (lane 2) and 413 bp when from infected oyster (c.f. Fig. 6). Three RFLP profiles were observed upon digestion with *HhaI*. An "O" type profile gave 2 bands of 226-bp and 156-bp respectively (lane 3) while a "M" type profile gave 2 bands of 156 + 157 and 68-bp (lane 4). A third profile corresponds to a mixture of "M" and "O" types with three bands of 226, 156+157, and 68-bp (lane 5). The tested samples were derived from infected mussels (lane 2, 4, 5) and an infected oyster (lane 3).

interaction or pathogenicity. A follow-up study should aim at assessing differences between the two types, in characters such as ultrastructure or expression patterns. Even in the absence of knowledge of such functional differences between O and M types, the present evidence for genetic differentiation strongly supports the existence of two *Marteilia* species, which have been previously proposed (Comps et al. 1982; Figueras and Montes 1988; Grizel et al. 1974; Perkins 1976; Villalba et al. 1993b). *Marteilia refringens* and *M. maurini* may correspond to the O and M types, respectively.

Host/geographic area	Number of infected animals		Prevalence	
	"M" type	"O" type		
<i>M. edulis</i> La Trinité	15	1	15	40%
<i>O. edulis</i> La Trinité	1	20	20	50%
<i>M. edulis</i> Marennes	0	0	0	0%
<i>O. edulis</i> Marennes	0	15	15	70%
<i>M. gallo</i> Vigo	4	0	4	2%
<i>O. edulis</i> Vigo	0	0	0	0%
<i>M. gallo</i> Leucate	0	0	0	0%
<i>O. edulis</i> Leucate	0	16	16	60%
<i>M. gallo</i> Istria	7	0	7	5%
<i>O. edulis</i> Istria	0	0	0	0%

of oysters or mussels by the two *Marteilia* types, O and M was confirmed by the application of PCR-RFLP to cloned amplicons. The demonstration of coinfecting animals casts some doubt on a strict host specificity. Nevertheless, coinfection was rare and observed only in areas where the prevalence of both types was high. The lack of a strict host specificity has important consequences for understanding the transmissibility of the disease and for its prospective control. Therefore, further studies will have to focus on 1) the infection and development process of O and M types in heterologous hosts, 2) the types of propagules released by hosts in cases of coinfection, and 3) the possible role of mussels as a vector for O type transmission. Research is currently directed towards investigating these questions which are of central importance for the development of programmes to prevent the transfer of infected stocks of molluscs.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially funded by the EU DG XIV (contract FAIR CT: PL97-3640) and the EU DG VI through the Community Reference Laboratory for Mollusc Diseases, Ifremer, La Tremblade. The authors wish to acknowledge kind assistance of Dr. Zncric and Dr. Oraic (Croatian Veterinary Institute, Department of Fish Diseases and Aquaculture, Zagreb, Croatia.), Dr. Anne Thébault (Laboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER La Tremblade), and all the REPAMO staff for the sampling of infected animals. We also thank Dr. Helen McCombie for assistance with the English in this manuscript and Gregory Rocher for the illustrations.

LITERATURE CITED

- Aldard, R. D. & Ernst, I. 1995. Extended range of the oyster pathogen *Marteilia sydneyi*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 15:119-121.

- Alderman, D. J. 1979. Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. *Mar. Fish. Rev.*, **41**:67–69.
- Auffret, M. & Poder, M. 1983. Recherches sur *Marteilia maurini*, parasite de *Mytilus edulis* sur les côtes de Bretagne nord. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **47**:105–109.
- Balouet, G., Chastel, C., Cahour, A., Quillard, A. & Poder, M. 1979. Etude épidémiologique et pathologique de la maladie de l'huitre plate en Bretagne. *Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit.*, **289**:13–23.
- Berthe, F. C. J., Pernas, M., Zerabib, M., Haffner, P., Thébault, A. & Figueras, A. J. 1998. Experimental transmission of *Marteilia refringens* with special considerations for its life cycle. *Dis. Aquat. Org.*, **34**:135–144.
- Berthe, F. C. J., Le Roux, F., Peyretailade, E., Peyret, P., Rodriguez, D., Gouy, M. & Vivarès, C. P. 2000. Phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA of *Marteilia refringens* validates the existence of phylum Paramyxea. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **47**:288–293.
- Comps, M., Grizel, H. & Papayanni, Y. 1982. Infection parasitaire causée par *Marteilia maurini* sp. nov. chez la moule *Mytilus galloprovincialis*. *Proc. I.C.E.S.*, **F**:1–3.
- Desportes, I. & Perkins, F. O. 1990. Phylum Paramyxea. In: Margulis, L., Corliss, J. O., Melkonian, M. & Chapman, D. J. (ed.), *Handbook of Protoctista*. Jones & Bartlett, Boston. p. 30–35.
- Figueras, A. J. & Montes, J. 1988. Aber disease of edible oysters caused by *Marteilia refringens*. *Amer. Fish. Soc. Special Publ.*, **18**:38–46.
- Figueras, A. J. & Robledo, J. A. F. 1993. Does *Marteilia* present in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) infect flat oysters (*Ostrea edulis*)? *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **13**:97–99.
- Galtier, N., Gouy, M. & Gautier, C. 1996. SEAVIEW and PHYLO-WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Applic. Biosci.*, **12**:543–548.
- Grizel, H. 1985. Etude des récentes épizooties de l'huitre plate (*Ostrea edulis* Linné) et leur impact sur l'ostreiculture bretonne. Dissertation, University of Sciences from Languedoc, Montpellier, France. 145 p.
- 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. *Sci. Pêche. Bull. Inst. Pêches Marit.*, **240**:7–29.
- Hide, G. & Tait, A. 1991. The molecular epidemiology of parasites. *Experientia*, **47**:128–140.
- Office International des Epizooties. (OIE) 2000. Code sanitaire international pour les animaux aquatiques. p. 105–108.
- Perkins, F. O. 1976. Ultrastructure of sporulation in the European flat oyster pathogen *Marteilia refringens*—taxonomic implications. *J. Protozool.*, **23**:64–74.
- Perkins, F. O. & Wolf, P. H. 1976. Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp. n.—Haplosporidian pathogen of Australian oysters. *J. Parasit.*, **62**:528–538.
- Robledo, J. A. F. & Figueras, A. J. 1995. The effect of culture-site, depth, season and stock source on the prevalence of *Marteilia refringens* in cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis* LMK.) from Galicia, Spain. *J. Parasitol.*, **81**:354–363.
- Robert, R., Borel, M., Pichot, Y. & Trut, G. 1991. Growth and mortality of the European oyster *Ostrea edulis* in the Bay of Arcachon (France). *Aquat. Living Resour.*, **4**:265–274.
- Saitou, M. & Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**:406–425.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**:5463–5467.
- Staden, R. 1996. The Staden sequence analysis package. *Mol. Biotechnol.*, **5**:233–241.
- Tigé, G. & Rabouin, M. A. 1976. Etude d'un lot de moules transférées dans un centre touché par l'épizootie affectant l'huitre plate. *Proc. I.C.E.S.*, **K**:1–10.
- Villalba, A., Mourelle, S. G., Carballal, M. J. & Lopez, M. C., 1993a. Effect of infection by the protistan parasite *Marteilia refringens* on the reproduction of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Org.*, **17**:205–213.
- Villalba, A., Mourelle, S. G., Carballal, M. J. & Lopez, M. C., 1997. Symbionts and disease of farmed mussels *Mytilus galloprovincialis* throughout the culture process in the Rias of Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Org.*, **31**:127–139.
- Villalba, A., Mourelle, S. G., Lopez, M. C., Carballal, M. J. & Azevedo, C. 1993b. Marteliiasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW Spain). I. Etiology, phases of the infection, and temporal and spatial variability in prevalence. *Dis. Aquat. Org.*, **16**:61–72.

Received: 08/01/00, 11/03/00, 01/16/01; accepted 02/26/01

Article 10 : Audemard & al., 2002



Needle in a haystack: involvement of the copepod *Paracartia grani* in the life-cycle of the oyster pathogen *Marteilia refringens*

C. AUDEMARD¹, F. LE ROUX¹, A. BARNAUD¹, C. COLLINS¹, B. SAUTOUR²,
P.-G. SAURIAU³, X. DE MONTAUDOUIN², C. COUSTAU⁴, C. COMBES⁴
and F. BERTHE^{1*}

¹Laboratoire Génétique et Pathologie, IFREMER, BP 133, 17390 La Tremblade, France

²Laboratoire d'Océanographie Biologique, UMR 5805 – Université Bordeaux I – CNRS, 2, rue du Professeur Jolyet, 33120 Arcachon, France

³Centre de Recherche en Ecologie Marine et Aquaculture, L'Houmeau, B.P.5, 17137 L'Houmeau, France

⁴Laboratoire de Biologie Animale, CNRS UMR 5555, CBETM, Université de Perpignan, 66860 Perpignan, France

(Received 10 July 2001; revised 19 September 2001; accepted 26 September 2001)

SUMMARY

Marteilia refringens is a major pathogen of the European flat oyster, *Ostrea edulis* Linnaeus. Since its description, the life-cycle of this protozoan parasite has eluded discovery. Attempts to infect oysters experimentally have been unsuccessful and led to the hypothesis of a complex life-cycle involving several hosts. Knowledge of this life-cycle is of central importance in order to manage oyster disease. However, the exploration of *M. refringens* life-cycle has been previously limited by the detection tools available and the tremendous number of species to be screened in enzootic areas. In this study, these two restrictions were circumvented by the use of both molecular detection tools and a mesocosm with low biodiversity. Screening of the entire fauna of the pond for *M. refringens* DNA was systematically undertaken using PCR. Here, we show that the copepod *Paracartia* (*Acartia*) *grani* is a host of *M. refringens*. Not only was DNA of *M. refringens* consistently detected in *P. grani* but also the presence of the parasite in the ovarian tissues was demonstrated using *in situ* hybridization. Finally, successful experimental transmissions provided evidence that *P. grani* can be infected from infected flat oysters.

Key words: *Marteilia refringens*, *Ostrea edulis*, *Paracartia grani*, PCR, *in situ* hybridization, experimental transmission.

INTRODUCTION

Marteilia refringens (Grizel *et al.* 1974), a major pathogen of the European flat oyster, *Ostrea edulis* Linnaeus, is responsible for important mortalities and economic losses in the oyster industry (Alderman, 1979; Figueras & Montes, 1988). During the past 3 decades of biological investigation, emergence of control strategies has been impeded by a major obstacle, which is elucidating the life-cycle of this protozoan parasite. Early field observations led authors to suspect the involvement of other host species in the transmission of *M. refringens* (Balouet, 1979; Balouet, Cahour & Chastel, 1979a; Balouet *et al.* 1979b; Grizel, 1985; Lester, 1986). This hypothesis was further supported when authors repeatedly failed to infect healthy oysters with oyster-derived parasites after cohabitation, injection or feeding (Balouet, 1979; Balouet *et al.* 1979a; Berthe *et al.* 1998). Although extensive efforts were

made to identify potential hosts, these studies were strongly impeded by the technical limits of histology, transmission electron microscopy and immunohistochemistry as screening tools, and complicated by the hundreds or thousands of species present in enzootic areas (Balouet *et al.* 1979b; Grizel, 1985).

In the present study, we circumvented the problem of species diversity by choosing particular natural oyster ponds, locally named 'claires', in the Marennes-Oléron Bay. Environmental characteristics of claires strongly limit the number of inhabiting species as compared with intertidal areas and oyster beds. Claires host less than 100 recognizable species (Reymond, 1991; Audemard *et al.* 2001), versus more than 1000 on open shores as Marennes-Oléron Bay (de Montaudouin & Sauriau, 2000). In addition, we recently developed a PCR-based tool allowing the detection of *Marteilia* DNA. Based on the sequence of the small subunit ribosomal RNA gene of *M. refringens*, specific polymerase chain reaction primers and *in situ* hybridization probes were designed (Le Roux *et al.* 1999; Berthe *et al.* 2000). PCR and *in situ* hybridization represent powerful tools for the detection of the parasite in potential

* Corresponding author: Laboratoire Génétique et Pathologie, IFREMER, BP 133, F- 17390 La Tremblade. Tel: +33 5 4636 9843. Fax: +33 5 4636 3751. E-mail address: fberthe@ifremer.fr

hosts, because they are sensitive, rapid and independent of both developmental stages of the parasite and location in host species (Mialhe *et al.* 1995). Here, we first used PCR to screen every species sampled in the claire ponds for the presence of *M. refringens*. When consistent detection of *M. refringens* was observed in a given species, presence of the parasite was assessed using *in situ* hybridization. Finally, experimental transmission of the parasite was performed to confirm involvement of the candidate species in the *M. refringens* life-cycle.

MATERIALS AND METHODS

Study site

Claire ponds in the Marennes-Oléron Bay (S-W France) are ponds with natural bottoms traditionally used for growing oysters (Korringa, 1976). Ponds which were used in this study, were located on the East Coast of Ile d'Oléron in the central zone of the Bay (Audemard *et al.* 2001). Water temperatures ranged from 8 °C in February to 25 °C in summer. From May to late September, mean values were higher than the 17 °C threshold necessary for infection of flat oysters by *M. refringens* (Grizel, 1985). Salinity ranged from 28 in spring (April) to 37 in summer (August). Species from the pond were sampled on a monthly or weekly basis for macrofauna, meiofauna, or zooplankton respectively (Audemard *et al.* 2001).

Screening by PCR

For each species sampled in the pond analysed individually or by batches in the case of small species, tissues were suspended in 10 volumes of extraction buffer (NaCl 100 mM, EDTA 25 mM, pH 8, SDS 0.5%) containing proteinase K (100 µg/ml). Following an overnight incubation at 50 °C, DNA was extracted using a standard protocol involving phenol/chloroform, and precipitation with ethanol. PCR was performed as described by Le Roux *et al.* (1999), with 2 different primer pairs: one pair CS1/CAS1, was common to 50 eukaryotic species examined including *Marteilia* (universal primers) providing an internal control of amplification experiments. The other, SS2/SAS1, was specific for *M. refringens* 18S rDNA (Berthe *et al.* 2000; Le Roux *et al.* 1999). PCR was performed in 50 µl with 10 ng of purified DNA mixed with 5 µl of PCR buffer 10×, 5 µl of 25 mM MgCl₂, 5 µl of 2 mM of each dNTP, 0.5 µl of each primer at 100 µM and 0.25 µl (1 unit) of *Taq* DNA polymerase (Promega). Samples were overlaid with mineral oil, denatured for 5 min at 94 °C and amplified by 30 cycles: 1 min at 94 °C for denaturation, 1 min at 55 °C for primers annealing, and 1 min at 72 °C for elongation in a thermal cycler apparatus (Appligene). Polymerization at 72 °C was then extended for 10 min to ensure completion of the amplified products.

In situ hybridization

Animals were placed in Davidson's fixative AFA (10% glycerine, 20% formalin, 30% 95° ethanol, 30% H₂O, 10% glacial acetic acid) for at least 24 h and then embedded in paraffin. The sections were subsequently treated by conventional histological procedures. *In situ* hybridization was performed as described by Le Roux *et al.* (1999). Sections were treated with proteinase K (100 µg/ml) in TE buffer (50 mM Tris, 10 mM EDTA), at 37 °C for 20 min. Slides were dehydrated by immersion in an ethanol series and air dried. Sections were placed in 50 µl of hybridization buffer (4× SSC, 50% formamide, 1× Denhardt's solution, 250 µg/ml yeast tRNA, dextran sulphate 10%) containing 10 ng of the labelled probe. Two probes were used: (1) the digoxigenin-labelled probe, called Smart 2 specific for *M. refringens* and (2) a host probe, labelled with digoxigenin by PCR with universal primers and host DNA as template to assess the quality and accessibility of targetted nucleic acid (Le Roux *et al.* 1999). Sections were covered with *in situ* plastic cover-slips and placed on a heating block at 95 °C for 5 min. Slides were then cooled on ice for 1 min before overnight hybridization at 42 °C in a humid chamber. Sections were washed twice for 5 min in 2× SSC at room temperature, and once for 10 min in 0.4× SSC at 42 °C. The detection steps were performed according to the manufacturer's instructions (Dig nucleic acid detection kit, Boehringer Mannheim).

Experimental infections

Uninfected oysters. Uninfected oysters, *Ostrea edulis* L., originating from the laboratory hatchery, were kept under laboratory conditions. Oysters were 2 years old at the time of the experiment. In total 30 oysters were checked at the time of the experiment for absence of *M. refringens* by means of digestive gland imprints.

Infected oysters. A batch of uninfected oysters originating from the laboratory hatchery, were placed in claire ponds during summer 1999 which led to their infection by *M. refringens*. They were then placed in laboratory tanks at 12 °C until the beginning of the experiment in summer 2000. At this temperature, the parasite does not develop further in its flat oyster host and is not released into the environment (Berthe *et al.* 1998). Oysters were 2 years old at the time of the experiment. *M. refringens* prevalence in these oysters was 87%. Before the experiment, oyster shells were cleaned with a brush to remove epibionts.

Uninfected copepods. Uninfected copepods, *Paracartia (Acartia) grani*, were reared in the laboratory

following previously described protocols (Guerrero & Rodriguez, 1998). A batch of 50 of these copepods was checked for the absence of *M. refringens* by means of PCR, as described above.

Infected copepods. Infected copepods, *P. grani* from the claire pond, were sampled every 4 days from August to September 2000. *In situ* hybridization was performed to test the presence of the parasite in *P. grani* on different sampling dates. Copepods were rinsed in filtered sea water and were directly added in tanks containing uninfected oysters.

Physical parameters of the experiments

The experimental and control tanks contained 20 l of filtered sea water. During the experiments, they were kept in the laboratory under natural photoperiod with temperature ranging from 22 to 28 °C. Algal food (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros pumilum* and *Tetraselmis suecica*) was produced in the laboratory and added every day to each tank. Water from the tanks was partially renewed every 4 days with filtered seawater.

Trial 1: Oyster to copepod transmission. The experiment started on the 24 July 2000 and lasted 25 days. This duration approximately corresponds to the longevity of an adult calanoid copepod stage.

Five infected flat oysters were placed on a 500 µm mesh located in the upper part of the tank. The mesh minimized the effect of oyster filtration currents and allowed contact of *M. refringens* sporonts shed with oyster faeces with the copepods. Uninfected copepods were added to the tanks at the beginning of the experiment. Three replicates of the experiment were performed. During the experiment, copepod samples were preserved in Davidson fixative for further *in situ* hybridization. The control experiment was designed as described above, but included uninfected flat oysters also placed on a mesh. Three replicates were performed.

Trial 2: Copepod to oyster transmission. Thirty uninfected flat oysters were placed on mesh in tanks. Copepods from the claire pond were added every 4 days, from August to September 2000. On 9 sampling dates of *P. grani* from the claire pond used in this trial, *M. refringens* was detected 3 times (on the 28 August, 4 and 11 of September) with prevalences below 12%. The experiment ended 1 month after the last copepods were added. At the end of the experiment, flat oysters were analysed by *in situ* hybridization. Three replicates were performed. The control consisted of tanks containing 30 uninfected flat oysters as described above, but no

copepods were added. At the end of the experiment, oysters were analysed by *in situ* hybridization. Three replicates of the experiment were performed.

RESULTS

Screening by PCR

The results are given in Table 1. For each species or taxon sampled in the claire pond, the number of individuals analysed is indicated in column 2. PCR was performed on individuals or groups of individuals with primers (column 3). The number of positive PCRs (assessing possible DNA amplification) is indicated in column 4. For each sample in which amplification had been obtained with CS1/CAS1 primers, PCR was performed with SS2/SAS1 primers specific for *M. refringens* and the number of positive detections is indicated in column 5.

Based on the PCR amplifications, 4 groups of species can be distinguished: the species showing 1/ no detection of *M. refringens*, 2/ very rare detection, 3/ consistent detection, or 4/ undetermined status (column 5).

Among the 62 taxa or species analysed by PCR, 36 taxa or species (Table 1) belonged to the first group (no detection) and 11 species belong to the second group (very rare detection). In the third group there were 2 species (the cnidarian *Cereus pedunculatus* and the copepod *Paracartia grani*), in which there was repeated detection. In the case of *C. pedunculatus*, *M. refringens* DNA was detected 48 times out of 273. Regarding *P. grani*, *M. refringens* DNA was detected in 5 batches out of 6. The last group consisted of 13 species where no DNA amplification had been obtained by PCR, when performed with universal primers.

In situ hybridization

Given the consistent detection of *M. refringens* DNA in *C. pedunculatus* and *P. grani*, *in situ* hybridization was performed with Smart2 probe in order to localize the parasite in potential host tissues.

Cereus pedunculatus

No hybridization was observed with Smart2 in the tissues of 70 *C. pedunculatus* analysed (result not shown). Quality and accessibility of targeted nucleic acid was assessed by controls.

Paracartia grani

Observations were made on copepodid (juveniles) and adult stages. Hybridization with Smart2 was observed within the tissues of *P. grani*. The parasite

Table 1. Screening by PCR of the total fauna sampled in the claire pond model

(Results of the screening by PCR of species sampled in the claire pond. PCR was first performed with 'universal' primers (PCR CS1/CAS1) and, in the case of amplification, with SS2/SAS1 primers. 'A', Ascidia; 'An', Annelida; 'C', Crustacea; 'Ch', Chaetognatha; 'Cn', Cnidaria; 'E', Echinodermata; 'F', Pisces; 'I', Insecta; 'M', Mollusca; 'N', Nematoda; 'Ne', Nemertea; 'Pl', Platyhelminthes.)

Genus species	Number of individuals analysed	Number of PCR using CS1/CAS1 primers	Number of positives with CS1/CAS1 primers	Number of Group PCR using SS2/SAS1 primers	Group
<i>Microdeutopus grillotalpa</i> (C)	731	61	49	0/49	1
<i>Palae monetes varians</i> (C)	287	53	44	0/44	1
<i>Pomatochistus microps</i> (F)	250	44	42	0/42	1
<i>Orchestia gammarella</i> (C)	140	53	37	0/37	1
<i>Hediste diversicolor</i> (An)	496	117	28	0/28	1
<i>Gammarus insensibilis</i> (C)	146	29	27	0/27	1
<i>Paleomon serratus</i> (C)	190	38	26	0/26	1
Harpacticoid spp. (C)	862	17	15	0/15	1
<i>Corophium achuresicum</i> (C)	334	16	15	0/15	1
<i>Notomastus latericeus</i> (An)	133	15	15	0/15	1
<i>Melita palmata</i> (C)	201	27	14	0/1	1
<i>Hydrobia ventrosa</i> (M)	462	16	12	0/12	1
Decapod larvae (zoe I) (C)	204	15	12	0/12	1
<i>Holothuria</i> sp. (E)	242	11	11	0/11	1
<i>Corophium</i> sp. (C)	102	20	8	0/8	1
Nematoda spp. (N)	514	10	8	0/8	1
<i>Balanus improvisus</i> (C)	30	7	7	0/7	1
<i>Tubificoides benedeni</i> (An)	47	7	7	0/7	1
<i>Leucophytia bidentata</i> (M)	56	14	6	0/6	1
<i>Hydrobia ulvae</i> (M)	129	21	6	0/6	1
<i>Spionidae</i> sp. (An)	39	6	4	0/4	1
<i>Anguilla anguilla</i> (F)	4	4	4	0/4	1
Gastropod larvae (M)	116	4	4	0/4	1
Platyhelminth spp. (Pl)	14	4	4	0/4	1
<i>Acartia discaudata</i> (C)	42	2	2	0/2	1
<i>Amphipholis squamata</i> (E)	7	2	2	0/2	1
<i>Chlamys varia</i> (M)	2	2	2	0/2	1
<i>Haliplanella luciae</i> (Cn)	2	2	2	0/2	1
<i>Nephtys humbergii</i> (An)	4	2	2	0/2	1
Ascidian larva (A)	14	2	1	0/1	1
Polychaeta annelid larva (An)	49	2	1	0/1	1
<i>Acartia bifilosa</i> (C)	35	1	1	0/1	1
Chaetognath sp. (Ch)	9	1	1	0/1	1
<i>Pseudopolydora antennata</i> (An)	8	1	1	0/1	1
<i>Alkmaria romijni</i> (An)	349	16	1	0/1	1
<i>Abra tenuis</i> (M)	32	5	1	0/1	1
<i>Molgula manhandtensis</i> (A)	167	116	112	1/112	2
<i>Lineus gisserensis</i> (Ne)	118	35	24	4/24	2
Decapod larvae (zoe II) (C)	570	28	23	1/23	2
<i>Canuella perplexa</i> (C)	966	19	19	1/19	2
<i>Haminoea hydatis</i> (M)	161	24	15	1/15	2
Juveniles of <i>Pomatochistus microps</i> (F)	282	17	15	3/15	2
Cyclopoid spp. (C)	362	15	14	1/14	2
<i>Euterpina acutifrons</i> (C)	362	15	14	2/14	2
Ostracod spp. (C)	287	10	10	1/10	2
<i>Streblospio shrubsolei</i> (An)	44	8	6	1/6	2
<i>Abra segmentum</i> (M)	166	29	2	1/2	2
<i>Cereus pedunculatus</i> (Cn)	732	345	273	48/273	3
<i>Paracartia grani</i> (C)	285	8	6	5/6	3
<i>Corophium volutator</i> (C)	32	6	0	ND	4
<i>Chironomus salinarius</i> (I)	30	3	0	ND	4
<i>Praunus flexuosus</i> (C)	23	1	0	ND	4
<i>Idothea chelipes</i> (C)	22	5	0	ND	4
<i>Carcinus maenas</i> (C)	13	13	0	ND	4
<i>Crangon crangon</i> (C)	11	6	0	ND	4
Isopod sp. (C)	8	2	0	ND	4
<i>Doris verrucosa</i> (M)	5	5	0	ND	4
<i>Eulalia veridis</i> (An)	3	1	0	ND	4
<i>Cerastoderma edule</i> (M)	2	2	0	ND	4
<i>Ephydriidae</i> sp. (I)	1	1	0	ND	4
<i>Facellina coronata</i> (M)	1	1	0	ND	4
<i>Polydora ciliata</i> (An)	1	1	0	ND	4

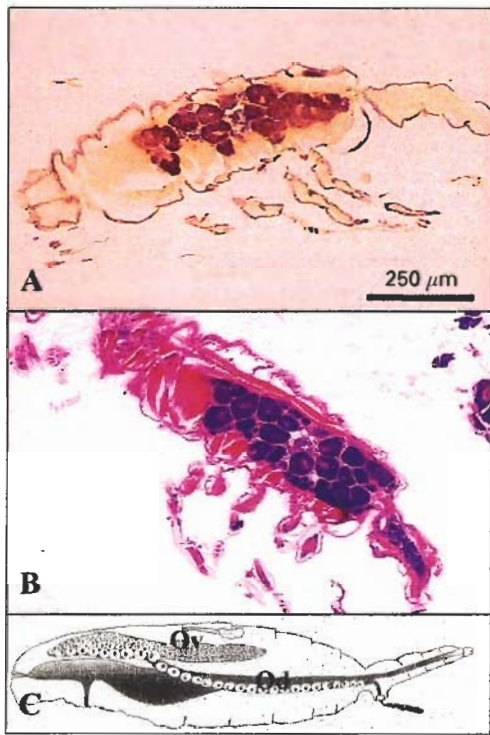


Fig. 1. Slides of a female *Paracartia grani* treated by *in situ* hybridization with Smart 2 probe (A), and treated for conventional histology (Hemalum Eosin) (B). Schematic representation of a female copepod reproductive system (C) with the germinal site of ovary (ov) and oviduct (od). On each figure, the anterior part of the copepod is on the left.

was detected (brown staining) in copepodid and adult females and located in the ovary (Fig. 1A, B, C). *M. refringens* was never detected in male copepods. The maximum prevalences of the parasite were 26%, ($n = 85$) in copepodid females and 23% ($n = 66$) in adult females in August.

Experimental transmission of *Marteilia refringens*

Trial 1. After 7 days of cohabitation with infected flat oysters as described above, females of *P. grani* were infected by *M. refringens* with a prevalence of 3% ($n = 65$). During the experiment, the prevalence ranged from 1.5% ($n = 65$) to 3% ($n = 33$, Table 2) depending on the day of experiment (Table 2). Oysters and both male and female copepods from the controls remained uninfected during the experiment.

Trial 2. After 72 days of cohabitation with copepods sampled in the claire pond, the 90 flat oysters from the trial remained uninfected when analysed by *in situ* hybridization.

DISCUSSION

Marteilia refringens belongs to the phylum Paramyxia, which contains protistan parasites, infectious for marine invertebrates (Desportes & Perkins, 1990;

Berthe *et al.* 2000). Paramyxian parasites are characterized by the formation of spores consisting of several cells enclosed inside one another, which result from internal cleavage within a stem cell. In the phylum Paramyxia, the species *M. refringens* in Europe and *M. sydneyi*, a parasite of *Crassostrea glomerata* (*Saccostrea commercialis*) in Australia (Perkins & Wolf, 1976; Adlard & Ernst, 1995) have been extensively studied but their life-cycle has remained uncharacterized.

As an approach to identifying potential host species participating in the transmission of *M. refringens*, we performed an exhaustive screening of the fauna of claire pond. Using PCR amplification of *M. refringens* DNA, we distinguished 4 groups of species: species where the parasite DNA was never, occasionally, or consistently amplified, as well as species where DNA amplification had not been obtained (even using universal primers). The distinction between these 4 groups allowed species presenting consistent detection of the parasite to be selected as the most probable candidates as *M. refringens* hosts. To draw conclusions on the status of a species as a host of *M. refringens*, several parameters have to be taken into account, such as the number of individuals sampled, the number of analyses performed, possible DNA amplification, and the presence of the parasite. For example, a limited number of individuals showing poor DNA amplification and no detection of the parasite does not allow a decision on the status (potential host or not) of the species.

The first limiting factor can be seen in the number of individuals sampled. This number mainly depends on the abundance of the species in the claire biotope and on the sampling strategy. As a consequence, it was difficult to decide on the status of scarce species such as *Anguilla anguilla*, platyhelminth species, *Amphipholis squamata*, *Chlamys varia*, *Haliplanelle luciae*, *Nephtys humbergii*, chaetognath species, *Pseudopolydora antennata*, *Doris verrucosa*, *Eulalia veridis*, *Cerastoderma edule*, Ephyridiidae, *Facellina coronata*, *Polydora ciliata*. For these species, additional efforts should be made on the sampling frequency in order to increase the number of animals to be analysed. Nevertheless, if these species were infected by *M. refringens*, one can assume that the naturally low abundance of animals should be balanced by a higher parasite prevalence and infection level, therefore allowing the detection of *M. refringens* in the course of this study.

A second limiting factor is the number of analyses performed. For small size species (especially species from the meiofauna and zooplanktonic species), DNA extraction was realised on a pool of individuals. This could result in a dilution of the targeted DNA (i.e. *M. refringens* DNA) and, possibly induce an underestimate of the parasite presence. As an example, in the case of Harpacticoid copepods, pooling reduced 862 sampled individuals into 17

Table 2. Results of the experimental transmission of *Marteilia refringens* from infected oysters to *Paracartia grani*

(Results of the experimental transmission of the parasite *M. refringens* between infected flat oysters and uninfected copepods. Prevalence of the parasite obtained by *in situ* hybridization on female copepods from the trial and the control (with the number of infected animals/the total number of females analysed). Disappearance of copepod was noted in the control on the 17th and 25th days of experiment.)

Time of exposure of copepods to flat oysters (day)	Prevalence of <i>M. refringens</i> in copepods from the control	Prevalence of <i>M. refringens</i> in copepods from the trial
0 (beginning of the experiment)	0% (0/60)	0% (0/60)
3	0% (0/44)	0% (0/30)
7	0% (0/41)	3% (2/65)
10	0% (0/17)	1.5% (1/65)
17	No copepod	3% (1/33)
25	No copepod	0% (0/10)

performed analyses. On the other hand, reducing 285 individuals of *P. grani* to 8 analyses yielded 5 positive PCR results.

The third limitation encountered during this study, came from the absence or the low rate of DNA amplification during PCR when performed with universal primers. The absence of DNA amplification could be explained by the presence of inhibitory factors contained in the shell of crustaceans or molluscs (Wilson, 1997; Le Roux *et al.* 1999). For example, shells of the shrimp *Palaemon serratus* were removed during this study, and led to a substantial improvement of the PCR reaction. However, shells of small crustaceans (*Corophium volutator*, *Idothea chelipes*), insects (Ephydriidae) or molluscs (*Abra segmentum*, *Hydrobia ulvae*) could not be removed because of their small size, and they probably inhibited PCR amplification. For some species such as *Hediste diversicolor*, and *Carcinus maenas* the low rate of DNA amplification probably resulted from DNA degradation. In future studies, the time between sampling and sample preservation (which could last for 3 h due to the sorting of species) would have to be shortened to avoid DNA degradation. Similarly, alternative DNA extraction methods would have to be tested (Ferraris & Palumbi, 1996).

Finally, the absence of detection of *M. refringens* can be seen as a failure of the overall strategy (sampling and screening). When taking into account the different factors cited above, most of the species included in this study cannot be firmly excluded from the hypothetical life-cycle. In contrast, the consistent detection of the parasite obtained in *P. grani* and *C. pedunculatus* strongly supported the hypothesis of their involvement in *M. refringens* life-cycle.

In order to discriminate between true parasitism and presence of *M. refringens* in the digestive tract or on the body surface, *in situ* hybridization was

performed to localize the parasite in tissue sections. *In situ* hybridization experiments demonstrated presence of *M. refringens* in the ovary of *P. grani*. The ovarian tissue was frequently observed to be overwhelmed by *M. refringens* in the form of large numbers of small cells within oocytes. Observed stages of *M. refringens* in *P. grani*, appeared to be morphologically different from the known stages observed in oyster digestive gland, although further transmission electron microscopy studies are obviously needed to characterize these developmental stages. The ovarian location of *M. refringens* may be surprising. However, other paramyxean parasites are known to target gonads of marine invertebrates: *Marteilioides chungmuensis* in *Crassostrea gigas* (Comps, Park & Desportes, 1986) and *Paramarteilia orchestiae* in *Orchestia gammarellus* (Ginsburger-Vogel & Desportes, 1979). The ovary appears during the moult of the first copepodid stage and keeps developing until the sexually mature adult stage (Schram, 1986). Infestation of the ovaries of some copepods has already been described in the case of microsporidian parasites (Andreadis, 1988; Micieli, Garcia & Becnel, 2000) and infection of ovarian tissues does not seem to impede seriously normal metabolic processes (Andreadis, 1988).

Involvement of *P. grani* in the life-cycle of *M. refringens* seems consistent with both the ecology of this copepod and the epidemiology of the disease. *Paracartia grani* is mainly observed in bays and estuaries during spring and summer season (Alcaraz, 1983; Rodriguez & Jimenez, 1990; Rodriguez, Guerrero & Bautista, 1995; Guerrero & Rodriguez, 1998) as it is the case in the claire ponds where it may represent 100% of the total copepod abundance. The seasonal cycle of *M. refringens* appears to match the life-cycle of *P. grani*, as it was shown that transmission occurs during summer (Grizel & Tigé, 1977; Grizel, 1985). During winter, sporangia

primordia of *M. refringens* observed in flat oysters do not develop. In spring, increase of water temperature fosters *M. refringens* development (Balouet, 1979; Berthe *et al.* 1998). Similarly, *P. grani* is absent from the water during winter (Rodriguez & Jimenez, 1990; Rodriguez *et al.* 1995; Guerrero & Rodriguez, 1998) to reappear in spring from resting benthic eggs. These eggs could play a role in overwintering of the parasite as reservoir for the parasite which will be investigated in future studies.

The geographical range of *P. grani* also matches *M. refringens* distribution. In Europe, marteiliosis has been reported to be restricted to north-western Brittany, the Bay of Biscay and the Mediterranean Sea, including the Atlantic coasts of Spain and the Adriatic coasts of Italy and Croatia. *Paracartia grani* is a warm temperate species originating from the tropical and temperate Atlantic coast. It is a calanoid copepod typical of coastal, semi-confined ecosystems, conditioned by instability of both physical parameters (temperature and salinity) and biological conditions (quality and quantity of available food). This species is often observed in the vicinity of oyster beds (Gallo, 1981) and has been observed within the geographical range of the disease; in estuaries or bays where the parasite has been reported (Lubet, 1953; Paulmier, 1965, 1969; Alcaraz, 1983; Elbéé (D') & Castel, 1995; Siokou-Frangou *et al.* 1997; Razouls & Bovée, 1999).

Determination of the role of *P. grani* in the life-cycle of *M. refringens* requires further experimental validation. Transmission of *M. refringens* from flat oysters to copepods was proved to be effective and rapid, as it was detected after 7 days of exposure to infected oysters. However, the prevalence of *M. refringens* in *P. grani* obtained by the experimental transmission was low. This could be due to a weak inoculum of parasites since the source of *M. refringens* consisted of oysters previously maintained at 12 °C and placed in experimental aquaria. They experienced a sharp increase of water temperature, which induced a synchronous release of sporangia in the faeces (Berthe *et al.* 1998). Consequently, the experimental design may have led to a unique flash of parasites, while a continuous release of parasite sporangia may occur under natural conditions. We therefore cannot assume that experimental conditions were optimal for transmission of the parasite from oysters to copepods.

No transmission of *M. refringens* was observed from copepods to oysters in our experiments. This also could result from non-optimal experimental conditions. The source of parasite may have been too weak to enable transmission. Presence of *M. refringens* in females of *P. grani* sampled in the summer 2000 was rare and the prevalence was low (less than 12%). In 2000, both copepods and oysters from the claire pond exhibited low prevalence of *M. refringens* as compared with the previous year where prevalence

in adult copepods and oysters was respectively, 26% and 87%.

The absence of parasite transmission in trial 2 could also reflect the involvement of a third species in the life-cycle of *M. refringens*. When considering this hypothesis, a candidate was *C. pedunculatus* in which the parasite was recurrently detected. *In situ* hybridization performed on 70 individuals never demonstrated *M. refringens* in tissues of *C. pedunculatus*. Consequently, detection of the parasite by PCR could be attributed to phoresy or ingestion of sporangia, infected copepods, or free-living stages of *M. refringens* because cnidarians are non-selective feeders (Van Praët, 1985). Among the 273 PCRs performed, 45 out of 190 (23%) were positive when *C. pedunculatus* was sampled on oysters while 3 out of 83 (4%) were positive when sampled on the sediment of the claire pond (data not shown). Thus, detection of the parasite DNA in *C. pedunculatus* seems to be correlated with the geographical distance from *M. refringens*-infected oysters. However, considering recurrent detection of the parasite, we can not exclude that *C. pedunculatus* may play a role in the *M. refringens* life-cycle, for example, in allowing capacitation or maturation of the parasite within the digestive cavity of this species. Future transmission experiments would have to investigate the role of this species in the *M. refringens* life-cycle.

From a more general point of view, the case of the cnidarian *C. pedunculatus* illustrates the confinement situation of claire ponds. In this ecosystem, species leading to occasional detection of *M. refringens* are numerous and it is difficult to discriminate accidental carriers from inconspicuous hosts. In the claire, *M. refringens* is present in oysters and copepods, as well as in sporangia released within oyster faeces. Other stages of *M. refringens* may exist, as free-living stages or within copepod eggs. *M. refringens* may be part of the food web of the claire pond, directly or indirectly. Considering the size of *M. refringens* sporangia ranging from 9 to 19 µm (Grizel *et al.* 1974; Perkins & Wolf, 1976), they could potentially be ingested by various pond microphageous species, including decapod larvae, copepods (cyclopoids, *Canuella perplexa* and *Euterpina acutifrons*), and ostracods (Dusart & Defaye, 1995; Vannier, Abe & Ikuta, 1998). The parasite could also be present within the digestive tract of annelid *Streblospio* spp., as they feed at the water interface upon suspended, resuspended and deposited material where the parasite can be present (Dauer, Maybury & Ewing, 1981). Nemeritean (*Lineus* spp.) or fish, *Pomatostichus* sp, may ingest not only free-living stages but also infected copepods. Phoresy of the parasite on the body surface may also explain occasional detection of the parasite. Basically, as *M. refringens* may be present on the sediment (at least as sporangia within oyster faeces) and in the water column, transport is conceivable by any benthic or pelagic species. If

experimental transmissions from *P. grani* to *O. edulis* recurrently fail, these species will have to be studied further as potential host of *M. refringens*.

In conclusion, we demonstrated in the course of this study, that at least 2 species are involved in the life-cycle of *M. refringens*: *O. edulis* and *P. grani*. Transmission experiments between *O. edulis* and *P. grani* were successful, demonstrating that the 2 species are contiguous in the life-cycle of the parasite. First attempts of reverse transmission failed. Design of this experiment should be improved by enhancing the inoculum of *M. refringens*. This could be achieved by improving transmission rate from oysters to copepods reared in the laboratory or relying on better environmental conditions to increase naturally prevalence in copepods populations.

We are grateful for the contributions of S. Bodin, B. Chollet and the staff of the 'Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole' for their technical assistance. Authors would like to thank M-C. Sajus, M. Lucas and E. Morin for their involvement during the screening of the fauna and M. Audemard for adding her English touch. This study was supported by the European Community funding under the FAIR programme, project MARS (FAIR CT/PL97-3640).

REFERENCES

- ADLARD, R. D. & ERNST, I. (1995). Extended range of the oyster pathogen *Marteilia sydneyi*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **15**, 119–121.
- ALCARAZ, M. (1983). Coexistence and segregation of congeneric pelagic Copepods, spatial distribution of the *Acartia* complex in the ria of Vigo (NW Spain). *Journal of Plankton Research* **5**, 891–900.
- ALDERMAN, D. J. (1979). Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. *Marine Fishery Review* **41**, 67–69.
- ANDREADIS, T. G. (1988). Comparative susceptibility of the copepod *Acanthocyclops vernalis* to a Microsporidian parasite, *Amblyospora connecticus*, from the mosquito *Aedes cantator*. *Journal of Invertebrate Pathology* **52**, 73–77.
- AUDEMARD, C., BARNAUD, A., COLLINS, C. M., LE ROUX, F., SOURIAU, P.-G., COUSTAU, C., BLACHIER, P. & BERTHE, F. C. J. (2001). Claire ponds as an experimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies: new perspectives. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **257**, 87–108.
- BALOUET, G. (1979). *Marteilia refringens* – considerations of the life-cycle and development of Aber disease in *Ostrea edulis*. *Marine Fishery Review* **41**, 64–66.
- BALOUET, G., CAHOUR, A. & CHASTEL, C. (1979 a). Epidémiologie de la maladie de la glande digestive de l'huître plate: hypothèse sur le cycle de *Marteilia refringens*. *Haliotis* **8**, 323–326.
- BALOUET, G., CHASTEL, C., CAHOUR, A., QUILLARD, A. & PODER, M. (1979 b). Etude épidémiologique et pathologique de la maladie de l'huître plate en Bretagne. *Sciences et Pêche, Bulletin de l'Institut des Pêches maritimes* **289**, 13–22.
- BERTHE, F. C. J., PERNAS, M., ZERABIB, M., HAFFNER, P. H., THÉBAULT, A. & FIGUERAS, A. J. (1998). Experimental transmission of *Marteilia refringens* with special consideration of its life-cycle. *Diseases of Aquatic Organisms* **34**, 135–144.
- BERTHE, F. C. J., LE ROUX, F., PEYRETAILLADE, E., PEYRET, P., RODRIGUEZ, D., GOUY, M. & VIVARES, C. P. (2000). Phylogenetic analysis of the small unit ribosomal RNA of *Marteilia refringens* validates the existence of the phylum Paramyxea (Desportes and Perkins, 1990). *Journal of Eukaryotic Microbiology* **47**, 288–293.
- COMPS, M., PARK, M. S. & DESPORTES, M. S. (1986). Etude ultrastructurale de *Marteilioides chungmuensis* n.g., parasite des ovocytes de l'huître *Crassostrea gigas* Th. *Protistologica* **22**, 279–285.
- DAUER, D. M., MAYBURY, C. A. & EWING, R. M. (1981). Feeding behavior and general ecology of several Spionid Polychaetes from the Chesapeake bay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **54**, 21–38.
- DESPORTES, I. & PERKINS, F. O. (1990). Phylum Paramyxea. In *Handbook of Protozoa* (ed. Margulis, L., Corliss, J. O., Melkonian, M. & Chapman, D. J.), pp. 30–35. Jones and Bartlett Publishing Corporation, Boston.
- DUSSART, B. H. & DEFAYE, D. (1995). Copepoda: introduction to the Copepoda. In *Guides to the Identification of the Macroinvertebrates of the Continental Waters of the World, no. 7* (ed. Dumont, H. J. F.), pp. 43–52. SPB Academic Publishing, The Hague.
- ELBÉE (D'), J. & CASTEL, J. (1995). Evolution spatio-temporelle du zooplancton dans le bassin d'Arcachon: le rôle des variables de milieu. *Cahiers de Biologie Marine* **36**, 33–45.
- FERRARIS, J. D. & PALUMBI, S. R. (1996). *Molecular Zoology: Advances, Strategies and Protocols*. John Wiley and Sons, New York, USA.
- FIGUERAS, A. J. & MONTES, J. (1988). Aber disease of edible oysters caused by *Marteilia refringens*. *American Fisheries Society Special Publication* **18**, 38–46.
- GALLO, J.-M. (1981). Les copépodes pélagiques de la Rochelle. *Annales de la Société des Sciences Naturelles de la Charente-Maritime* **6**, 847–850.
- GINSBURGER-VOGEL, T. & DESPORTES, I. (1979). Etude ultrastructurale de la sporulation de *Paramarteilia orchestiae* gen. n. sp.n. parasite de l'amphipode *Orchestia gammarellus*. *Marine Fishery Review* **41**, 3–7.
- GRIZEL, H. (1985). Etude des récentes épizooties de l'huître plate *Ostrea edulis* Linné et de leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Ph.D. thesis, University of Science, Montpellier.
- 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. *Sciences et Pêche Bulletin de l'Institut des Pêches Maritimes* **240**, 7–30.
- GRIZEL, H. & TIGÉ, G. (1977). Observations sur le cycle de *Marteilia refringens*. *Haliotis* **8**, 327–330.
- GUERRERO, F. & RODRIGUEZ, V. (1998). Existence and significance of *Acartia grani* resting eggs (Copepoda: Calanoida) in sediments of a coastal station in the Alboran Sea (SE Spain). *Journal of Plankton Research* **20**, 305–314.

- KORRINGA, P. (1976). Farming the cupped oysters of the genus *Crassostrea*. A multidisciplinary treatise. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 2, Elsevier Scientific Publication Compilation, Amsterdam.
- LE ROUX, F., AUDEMARD, C., BARNAUD, A., GOUY, M. & BERTHE, F. C. J. (1999). Specific molecular probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Marine Biotechnology* **1**, 588–597.
- LESTER, R. J. G. (1986). Field and laboratory observations on the oyster parasite *Marteilia sydneyi*. In *Parasite Lives* (ed. Cremin, M., Dobson, C. & Moorhouse, D. E.), pp. 33–40. University of Queensland Press, Brisbane.
- LUBET, P. (1953). Variations saisonnières du zooplancton du bassin d'Arcachon. *Bulletin de la société zoologique de France* **78**, 204–216.
- MIALHE, E., BACHERE, E., BOULO, V., CADORET, J. P., SARAIVA, J., CARRERA, L., ROUSSEAU, C., CEDENO, V., CALDERON, J. & COLWELL, R. R. (1995). Future of biotechnology-based control of disease in marine invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **4**, 275–283.
- MICIELI, M. V., GARCIA, J. J. & BECNEL, J. J. (2000). Horizontal transmission of *Amblyospora albifasciati* Garcia and Becnel, 1994 (Microsporidia: Amblyosporidae), to a copepod intermediate host and the neotropical mosquito, *Aedes albifasciatus* (Macquart, 1837). *Journal of Invertebrate Pathology* **75**, 76–83.
- DE MONTAUDOUIN, X. & SAURIAU, P.-G. (2000). Contribution to a synopsis of marine species richness in the 'Pertuis Charentais Sea' with new insight in soft-bottom macrofauna of the Marennes-Oléron Bay. *Cahiers de Biologie Marine* **41**, 181–222.
- PAULMIER, G. (1965). Le microplancton de la rivière d'Auray. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* **29**, 211–223.
- PAULMIER, G. (1969). Le microplancton des rivières de Morlaix et de la Penzé. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* **33**, 311–332.
- PERKINS, F. O. & WOLF, P. H. (1976). Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp. n. – Haplosporidian pathogen of Australian oysters. *Journal of Parasitology* **62**, 528–538.
- RAZOULS, C. & DE BOVÉE, F. (1999). Diversité et répartition géographique chez les Copépodes planctoniques marins. <http://www.obsanyuls.fr/Copepodes/RAZOULS1.htm>
- REYMOND, H. (1991). Dynamique de la chaîne hétérotrophe benthique des marais maritimes en période estivale et son impact sur les productions aquacoles de carnivores: *Penaeus japonicus*, un modèle d'étude. Ph.D. thesis, University of Paris VI.
- RODRIGUEZ, V., GUERRERO, F. & BAUTISTA, B. (1995). Egg production of individual Copepods of *Acartia grani* Sars from coastal waters: seasonal and diel variability. *Journal of Plankton Research* **17**, 2233–2250.
- RODRIGUEZ, V. & JIMENEZ, F. (1990). Co-existence of congeneric species of *Acartia* (Copepoda; Calanoida): sexual dimorphism and ecological niche in *Acartia grani*. *Journal of Plankton Research* **12**, 497–511.
- SCHRAM, F. R. (1986). *Crustacea*. Oxford University Press, New York, USA.
- SIOKOU-FRANGOU, I., PAPANASSIOU, E., LEPRETRE, A. & FRONTIER, S. (1997). Zooplankton assemblages and influence of environmental parameters on them in a Mediterranean coastal area. *Journal of Plankton Research* **20**, 847–870.
- VANNIER, J., ABE, K. & IKUTA, K. (1998). Feeding in mydocopid ostracods: functional morphology and laboratory observations from videos. *Marine Biology* **132**, 391–408.
- VAN PRAËT, M. (1985). Nutrition of sea anemones. *Advances in Marine Biology* **22**, 65–99.
- WILSON, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied Environmental Microbiology* **63**, 3741–3751.

PROJET DE RECHERCHE

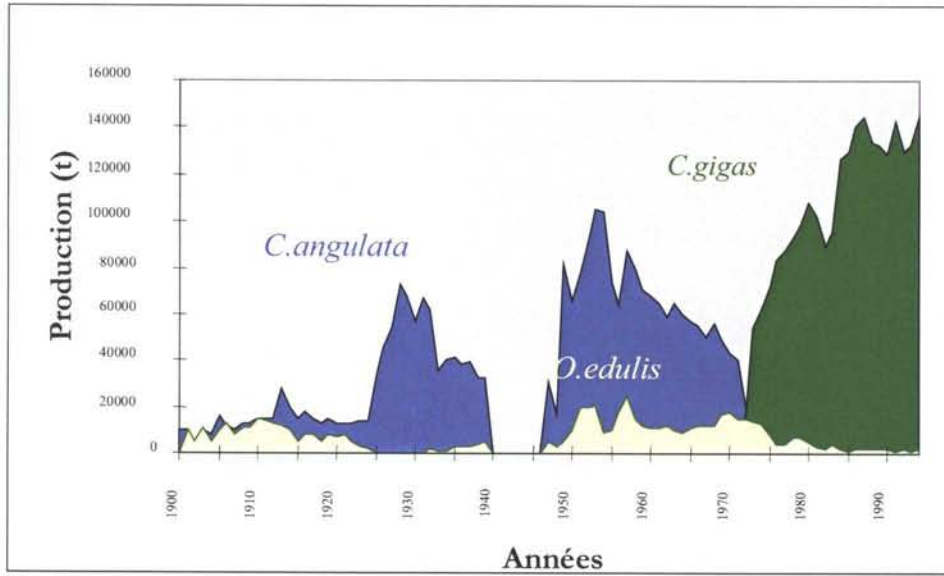


Figure 1: Production ostréicole en France depuis le début du siècle (d'après Gouletquer *et al*, 1998)

III-LE MODELE VIBRIOSE CHEZ CRASSOSTREA GIGAS

III.A- Introduction générale

L'ostréiculture a connu historiquement en France comme dans de nombreux pays une succession de phase de développement, de pleine exploitation et de crise le plus souvent liée à la surexploitation du milieu naturel et/ou à l'apparition de maladies. Ces dernières ont parfois fortement perturbé les productions et constituent aujourd'hui encore dans les zones où elles sévissent un frein considérable à l'élevage des huîtres (Figure 1). La gestion du risque zoonitaire est généralement liée aux caractéristiques biologiques des animaux et à leur mode d'élevage. En fait, peu de possibilités d'actions existent en matière de protection des cheptels vis-à-vis des maladies infectieuses. Le traitement de ces espèces, généralement élevées en milieu ouvert ou semi ouvert, n'est pas envisageable en raison du faible arsenal thérapeutique disponible, des quantités de substances à utiliser et des risques de bioaccumulation responsables de toxicité. Seuls les stades de développement précoces des huîtres dans des structures d'élevage contrôlées, écloséries et nurseries, font exception. Néanmoins, l'usage de traitements à ces stades a déjà donné lieu à l'apparition de résistance. Par ailleurs, les huîtres, comme tous les invertébrés, sont dépourvus d'immunité adaptative et ne sont donc pas vaccinables. La prophylaxie est donc le seul moyen actuellement de lutter contre les maladies infectieuses chez les mollusques (Berthe, 2002).

L'objectif essentiel de la prévention est de ne pas introduire, en zone indemne, d'animaux vivants sans l'assurance préalable qu'ils ne sont ni porteurs ni vecteurs de l'agent étiologique de la maladie. Au cours de mon second stage post-doctoral, l'étude du modèle constitué par l'huître plate, *Ostrea edulis* et son parasite *Marteilia refringens* m'a permis d'aborder le thème de la prévention du transfert des maladies. Il s'agissait notamment de déterminer si la moule pouvait être un vecteur de la marteiliose, ce qui nécessitait 1) de prouver l'existence de deux espèces de *Marteilia* en Europe l'une (*M. maurini*) infectant la moule, l'autre (*M. refringens*) infectant l'huître plate; 2) de rechercher des moules hébergeant *M. refringens*. Il s'agira dans l'avenir d'évaluer si le cycle du parasite est complet chez la moule.

En zone enzootique la gestion des maladies repose sur la connaissance des agents infectieux notamment leur cycle biologique et de leur mode de transmission. Dans ce contexte la sélection génétique et l'amélioration des pratiques d'élevages sont aussi des éléments de lutte contre la maladie. Dans cette perspective une connaissance des interactions complexes hôte-pathogène-environnement apparaît fondamentale. C'est dans ce domaine que s'inscrit mon activité de recherche au sein de l'Ifremer, ce qui m'a conduit à l'étude d'un modèle vibriose chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*.

III.B- Vibriose et aquaculture

Les maladies d'origine bactérienne représentent toujours une part très importante des pertes économiques enregistrées en élevage de poissons. En effet peu de moyens thérapeutiques existent et la prophylaxie sanitaire comme la prophylaxie médicale ne suffisent pas à endiguer complètement les maladies. Les vibrioses sont prépondérantes depuis des dizaines d'années dans la plupart des sites d'élevage mais aussi chez les poissons sauvages. *Vibrio anguillarum* apparaît comme l'espèce pathogène de poisson la plus étudiée et depuis quelques années la publication de nombreux résultats concernant les mécanismes de virulence de cette bactérie est une source précieuse d'informations y compris pour d'autres espèces de vibrios (voir chapitre virulence). *Vibrio splendidus* est aussi souvent associé à des épisodes de mortalité en élevage larvaire de turbot (Nicolas *et al.*, 1996 ; Farto *et al.*, 1999; Gatesoupe *et al.*, 1999).

Les maladies infectieuses, virales ou bactériennes représentent actuellement le plus gros frein au développement de la pénéiculture. En Nouvelle-Calédonie, la production de crevettes débutée à la fin des années 1970 a connu une expansion spectaculaire jusqu'en 1993, année au cours de laquelle une pathologie saisonnière à caractère épizootique a fait son apparition dans les élevages en saison fraîche (Boemare *et al.*, 1978 ; Goarant *et al.*, 1999 ; Goarant *et al.*, 2000). Cette maladie, qui a reçu le nom de Syndrome 93 a été attribuée à une bactérie, *Vibrio penaeicida*. Les contraintes induites, principalement l'abandon des élevages de saison fraîche, ont entraîné une baisse de la production, malgré l'augmentation des surfaces exploitées. Ce n'est qu'en 1995 que la production annuelle a rattrapé et dépassé le niveau atteint en 1992, et à partir de 1998 que les rendements ont dépassé ceux atteints en 1992. Toutefois, c'est également au cours de cette année 1998 qu'une nouvelle pathologie bactérienne, attribuée à un autre vibrio (*V. nigripulchritudo*) a fait son apparition sur une ferme de production dont elle menace sérieusement la survie économique. Cette nouvelle maladie, si elle devait se généraliser à l'ensemble des sites de production, risquerait fort d'anéantir la filière aquacole de Nouvelle-Calédonie.

Chez les mollusques, les vibrios apparaissent comme le genre bactérien le plus impliqué dans des épisodes de mortalités dues à des infections bactériennes. Dans la plupart des cas les vibrioses surviennent aux stades larvaires et en éclosion (Tubiash *et al.*, 1965 ; Brown et Losee, 1978 ; Disalvo *et al.*, 1978 ; Elston et Leibovitz, 1980a,b ; Jeffries *et al.*, 1982 ; Hada *et al.*, 1984). *Vibrio pectenicida*, par exemple, est un pathogène des larves de coquille St Jacques (Lambert *et al.*, 1998). Une souche de *V. splendidus* biovar II a été associée à des mortalités de larves d'huitres creuses *C. gigas* (Sugumar *et al.*, 1998). D'autres souches apparentées à *V. splendidus* ont également été associées à des mortalités de larves de coquilles (Lambert *et al.*, 1999). Quelques espèces de vibrios ont été définies comme pathogènes de mollusques adultes. *Vibrio tapetis*, agent causal de la maladie de l'anneau brun est responsable depuis quelques années de mortalités massives chez la palourde japonaise adulte. Si la pathogénèse associée à ce vibrio a fait l'objet de plusieurs publications (Paillard et Maes, 1990 ; Oubella *et al.*, 1994 ; Paillard *et al.*, 1994 ; Borrego *et al.*, 1996 ; Borrego *et al.*, 1996, Allam *et al.*, 2000a, b), les mécanismes de virulence ne sont pas à ce jour

élucidés. Chez la palourde, la pathogénie de certaines souches de *V. splendidus* a été démontré expérimentalement (Le Roux *et al.*, 2002). Parallèlement de nombreuses souches apparentées à cette espèce ont été isolées de palourdes subissant des mortalités anormales sans que *V. tapetis* ne soit détecté (Paillard, communication personnelle). *Vibrio harveyi/carchariae* a été associé à une épizootie récente d'ormeaux (*Haliotis tuberculata*) en éclosion. Ce vibron, pathogène de plusieurs poissons marins et de crevettes, est probablement à l'origine des mortalités massives d'ormeaux dans le milieu naturel sur les côtes bretonnes (Pederson *et al.*, 1984 ; Nicolas *et al.*, 2002). Enfin une souche de *V. lentus* pathogène d'*Octopus* a été isolée (Farto *et al.*, 2003). Dans ce modèle la description de la maladie a été facilitée par l'apparition de symptômes macroscopiques (lésion de la peau) précédant la mort des individus. En effet, chez les mollusques, l'une des difficultés rencontrée par le pathologiste est qu'en général aucun symptôme spécifique ne précède les mortalités.

Depuis une dizaine d'année, en période estivale, de forts taux de mortalité de naissains d'huîtres creuses (60 à 100%) sont observés régulièrement en milieu naturel et en éclosion. Cette « mortalité estivale » ne peut s'expliquer par l'unique intervention d'un agent infectieux (épizootie) et la piste d'une étiologie multifactorielle (environnement, hôte, pathogène) reste à privilégier (Gouletquer *et al.*, 1998). De plus, différentes cascades d'évènements pourraient être impliquées. Deux agents pathogènes ont été associés à ce syndrome : un virus de type herpes, OHV (Renault *et al.*, 1995) et deux souches de vibron apparentées à l'espèce *V. splendidus* (Lacoste *et al.*, 2001 ; Waechter *et al.*, 2002). L'étude du rôle des vibrions dans les mortalités de *C. gigas* est confrontée à deux problèmes majeurs : leur identification en temps qu'espèce et la caractérisation de leur relation vis à vis de l'hôte, commensaux, opportunistes ou pathogènes.

III.C- Taxonomie des vibrions

Les genres *Vibrio* et *Photobacterium*, les plus importants taxons de la famille des *Vibrionaceae*, font parti des genres bactériens les plus anciennement décrits. La première description d'un vibron, *V. cholerae*, a été faite par le physicien italien Filippo Pacini en 1854. Jusqu'à la moitié du 20^{ème} siècle, l'identification des vibrions est basée sur quelques descriptions phénotypiques: morphologie (flagelle, courbure de la cellule) croissance dans certains milieux de culture. Au début des années 90, un certain nombre de tests phénotypiques et une analyse en taxonomie numérique permettent de mieux identifier les bactéries appartenant à ce genre (Bauman *et al.*, 1980, Alsina et Blanch, 1994). Ces tests reposent sur l'utilisation de différents composés comme sources nutritives carbonées, la mise en évidence de certaines activités enzymatiques (arginine dihydrolase, lysine et orthonine décarboxylases, gélatinase, chitinase, oxydase, catalase), la tolérance au sel, la croissance à différentes températures, un antibiogramme et la composition GC du génome.

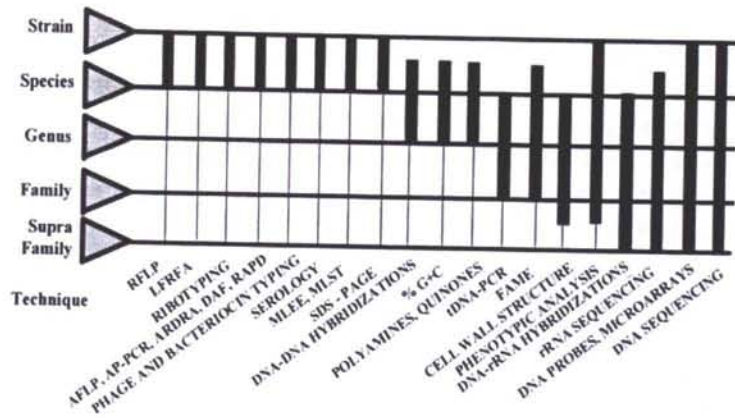


Figure 2: Résolution taxonomique des techniques les plus couramment utilisées (d'après Vandamme et al., 1996)

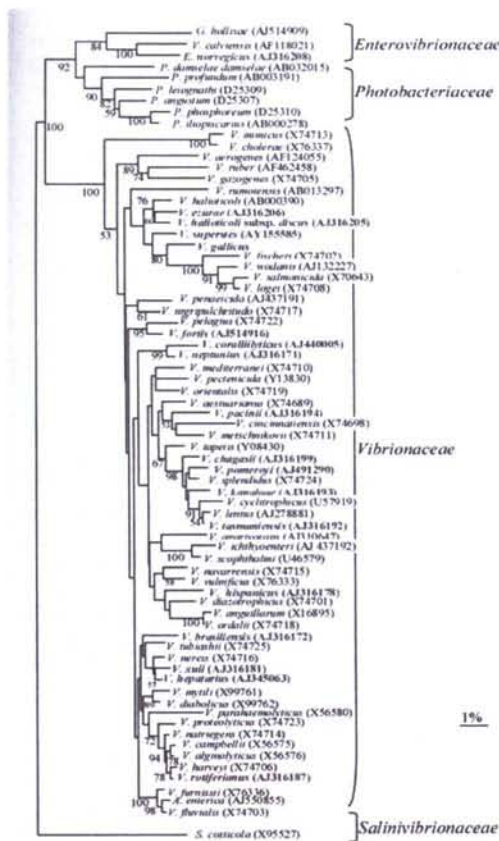


Figure 3: Espèces de vibron décrites en 2004, arbre phylogénétique basée sur le gène codant pour la petite sous unité ribosomique (Thompson, 2003)

Depuis une vingtaine d'années, l'étude de la phylogénie moléculaire basée sur la séquence des gènes ribosomiques a révolutionné la classification des bactéries. Les genres *Vibrio* et *Photobacterium* sont aujourd'hui placés dans le phylum des Proteobacteria, phylum qui contient 1600 espèces réparties en 5 classes : Alphaprotéobacteria, Betaprotéobacteria, Gammaprotéobacteria, Deltaprotéobacteria, Epsilonprotéobacteria (Thompson, 2003).

D'autres séquences d'intérêt phylogénétique, plus particulièrement celles codant des protéines, sont utilisées pour explorer les relations taxonomiques entre espèces à l'intérieur d'un genre (Yamamoto et Harayama 1995, 1998 ; Kwok *et al.*, 2002).

Les vibrions sont des bactéries Gram négatives, mobiles, allongées, chimio-organotrophes, présentant un métabolisme fermentatif facultatif et vivant dans des environnements aquatiques. Ils sont généralement cultivables sur milieu TCBS (thiosulfate-citrate-bile salt sucrose agar) et souvent oxydase positive. Une série de techniques phénotypiques et/ou génotypiques sont actuellement disponibles pour identifier et/ou typer les souches appartenant à ce genre (Figure 2). Le séquençage du gène 16S reste la méthode la plus utilisée. En 1980, le nombre d'espèces de vibrions décrites était de 20, en 2002 de 47, il est aujourd'hui de 62 (Figure 3).

L'identification d'une souche en terme d'espèce doit être confirmée par des expériences d'hybridation ADN-ADN qui reste la technique de référence selon les dernières recommandations du comité « Ad hoc » en systématique bactérienne (Stackenbrandt, 2002) : « deux souches appartiennent à la même espèce si elles présentent un taux d'hybridation ADN-ADN > 80% (Grimont, 1984) ». Le développement de techniques alternatives est encouragé, mais ne suffisent pas pour le moment à confirmer une identification.

Au cours de sa thèse de doctorat, Fabiano Thompson du Laboratoire de Microbiologie de Gand a réalisé un travail remarquable de clarification de la taxonomie des vibrions (Thompson, 2003). Dans ce travail, 506 souches de vibron ont été typées par la technique d'AFLP (Arbitrarily Fragment Length Polymorphism), 69 clusters ont été obtenus dont 31 groupes ne contenaient pas de souche type d'espèce. Des expériences d'hybridation ADN-ADN, le séquençage du gène 16S et une caractérisation phénotypique ont permis de décrire 15 nouvelles espèces. Thompson et coll. confirment que la technique d'AFLP représente une bonne alternative aux hybridations ADN-ADN. D'après ces analyses des similitudes de 60-70% en profil AFLP correspondraient à des similitudes génomiques >70%.

Les vibrions présentent la caractéristique tout à fait particulière au sein des bactéries de posséder un génome constitué de deux chromosomes circulaires. Ceci laisse supposer que ces bactéries ont développé des mécanismes uniques afin de coordonner les fonctions cellulaires de base tels que celles régissant la réplication, la ségrégation et la plasticité du génome (Yamaichi *et al.*, 1999). Parallèlement un grand nombre d'entre elles ont la propriété de se diviser très rapidement, *V. natrigens* et *V. parahaemolyticus* par exemple présentent un temps de génération de 9 min. La division du génome en deux chromosomes pourrait présenter un avantage pour la réplication de l'ADN.

A l'heure actuelle, les génomes de trois espèces appartenant à la même radiation ont été séquencés, *V. cholerae* (TIGR, USA) *V. parabaemolyticus* (GIRC, Japon) et *V. vulnificus* (NHRI Taiwan). La majorité des gènes essentiels aux fonctions cellulaires (réplication, transcription, traduction, biosynthèse) et de virulence (toxines, antigène de surface, adhésines) est localisée sur le grand chromosome.

Le petit chromosome contient une proportion plus importante de gènes hypothétiques et de gènes ayant une origine autre que les γ -Proteobacteria. La présence d'un super intégron, l'absence d'opérons rRNA et la proportion plus faible de gènes codant pour la machinerie cellulaire ont amené Heidelberg à proposer l'origine mégaplasmidique du second chromosome (Heidelberg *et al.*, 2000).

Les différences notables entre les génomes de *V. cholerae* et *V. parabaemolyticus* sont : i) la taille supérieure du petit chromosome (1.9 au lieu de 1.1 Mpb); ii) la présence du super intégron sur le grand chromosome (voir page 45); iii) l'îlot de pathogénicité contenant le gène *tdh* situé sur le petit chromosome (Makino *et al.*, 2003).

III.D- Virulence des vibriens

La virulence est définie comme la capacité d'une bactérie à entraîner une infection, elle-même définie comme la capacité d'une bactérie à s'établir dans l'hôte (Salyers et Whitt, 1994). Dans le cas d'une bactérie pathogène, cette infection peut se traduire par des symptômes résumés sous le terme de maladie. Au contraire, les bactéries mutualistes colonisent l'hôte sans entraîner de signes pathologiques et enfin les bactéries symbiotiques lui sont bénéfiques.

La frontière entre infection et colonisation est souvent diffuse. En effet, comme nous allons le voir par la suite, une bactérie n'entraînant aucun symptôme chez un individu immunocompétent pourra entraîner des troubles graves voir létaux chez des individus fragilisés. Face à cette difficulté, on parle donc de plus en plus d'agents infectieux opportunistes : organismes capables de nuire à l'hôte seulement s'il est immunodéficient. L'étude des maladies opportunistes est souvent méprisée, elle nécessite une approche intégrative en pathologie et physiologie; les agents infectieux opportunistes sont pourtant des causes importantes de maladies et de mort.

Les facteurs de virulence ou mécanismes de pathogénie sont des terminologies qui couvrent à la fois les produits bactériens ou la stratégie qui contribuent à la virulence. Là encore la définition de fonctions comme les mécanismes de virulence n'est pas simple. Certaines caractéristiques comme la capacité à adhérer aux tissus ou à produire des toxines ne posent *a priori* pas de problèmes quant à leur association aux mécanismes de virulence. Cependant le concept selon lequel quelques facteurs de virulence sont suffisants pour expliquer comment une bactérie entraîne une maladie est réducteur face à la complexité de l'interaction hôte/bactérie. D'autres mécanismes vitaux pour la bactérie, tel que l'obtention d'énergie à partir de la fermentation des sucres de l'hôte, ne sont pas considérés comme des mécanismes de virulence, bien qu'ils correspondent au parasitisme de l'hôte dont la bactérie tire sa source carbonée.

Enfin la liste des préceptes concernant la virulence ne serait pas close sans aborder la question des postulats de Koch. Le médecin allemand Robert Koch (1843-1910) fut le premier à démontrer la relation directe du rôle de bactéries (*Bacillus anthracis*, *Vibrio cholerae*) dans des maladies épidémiques. Son approche expérimentale le conduisit à définir des règles devant être satisfaites pour qu'un micro-organisme soit déclaré responsable d'une maladie (relations causales entre un micro-organisme et une maladie spécifique) connues sous le nom de postulat de Koch. Elles peuvent être résumées comme suit : 1) Le micro-organisme doit être présent dans chaque cas de maladie, mais absent des organismes sains ; 2) Le micro-organisme suspect doit être isolé et cultivé en culture pure ; 3) La maladie doit se développer quand le micro-organisme isolé est inoculé à un hôte sain ; 4) Le même micro-organisme doit de nouveau être isolé de l'hôte malade.

Au vu des connaissances actuelles en matière d'interaction hôte/bactérie la validité de ces postulats est aujourd'hui remise en cause. Ainsi, les premier et troisième postulats impliquent que la virulence est une caractéristique propre à la bactérie et indépendante de l'hôte. Or il est aujourd'hui clairement établi que la sensibilité de l'hôte à divers agent infectieux est un facteur clé du déclenchement d'une maladie. La bactérie peut donc être présente de façon asymptomatique chez un individu immunocompétent (porteur sain) mais au contraire entraîner une maladie chez un individu immunodéficient. Le second postulat dépend quant à lui de la capacité à cultiver le micro-organisme en conditions *ex vivo*, or il est clair qu'un grand nombre de bactéries ne sont actuellement pas cultivables dans des milieux synthétiques reconstitués. Plus préoccupant encore est le fait qu'une bactérie en milieu de culture synthétique peut perdre sa virulence. Une autre question se pose avec insistance, celle de l'identification précise du micro-organisme responsable quand dans la plupart des cas, l'espèce regroupe des souches de virulences variables. Parallèlement différentes espèces bactériennes peuvent entraîner les mêmes symptômes. Enfin, certaines maladies résultent de l'action conjointe de différentes espèces de bactéries ou d'une collaboration entre des bactéries et d'autres micro-organismes (protozoaires, virus).

La plupart des données bibliographiques concernant les mécanismes de virulence des vibrions, reposent sur des modèles de pathogènes humains : *V. cholerae*, *parahaemolyticus* et *vulnificus*, dont les génomes ont été entièrement séquencés (Heidelberg *et al.*, 2000; Makino *et al.*, 2003). Un travail important est également mené depuis plusieurs années par le groupe de Debra Milton en Suède sur le modèle *V. anguillarum*, un pathogène des poisson et mollusques. Chez le saumon, la reproduction expérimentale de la maladie est possible par baignade ou par injection du vibron (O'Toole *et al.*, 1996). Ceci permet de différencier les mécanismes intervenant dans la colonisation voir l'invasion de l'hôte des mécanismes toxiques qui altèrent l'hôte. La plupart des travaux publiés par ce groupe repose sur la caractérisation de gènes supports de virulence, qui ont été identifiés soit par criblage phénotypique d'une banque de vibrions mutants obtenu par insertion aléatoire de minitransposons, soit par criblage d'une banque génomique avec des fragments d'ADN obtenus par PCR avec des amorces dégénérées. Dans tous les cas, le rôle des gènes est confirmé après leur inactivation par mutagenèse dirigée (approche génétique). L'ensemble de ce travail constitue aujourd'hui une référence pour l'étude des mécanismes de virulence de vibrions pathogènes chez les espèces aquacoles.

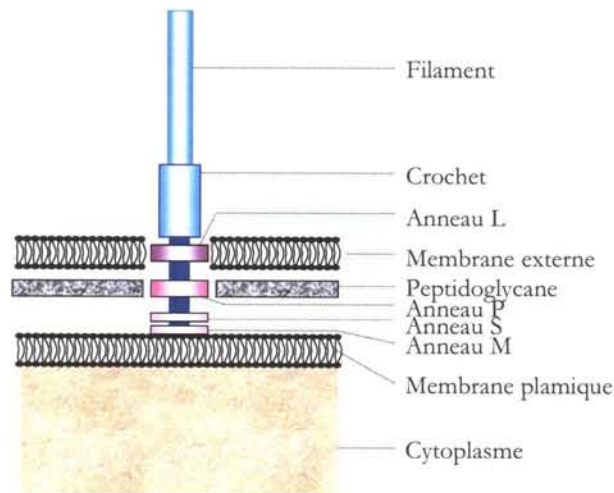


Figure 4: Ultrastructure du flagelle bactérien de bactérie gram négative (d'après Yorimitsu et Homma)

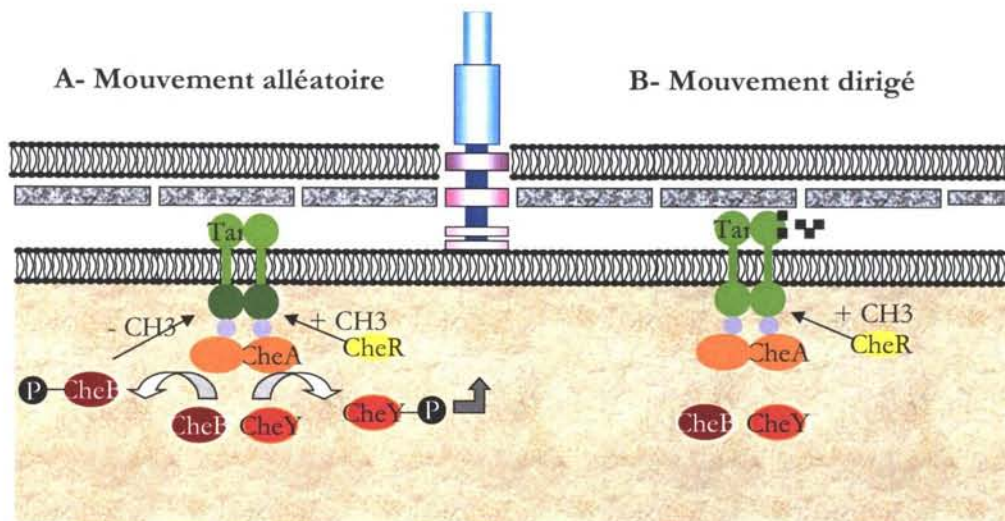


Figure 5: Les voies de transduction impliquées dans le chimiotactisme: A) L'hyperméthylation du récepteur active la kinase CheA qui phosphoryle CheY et CheB. CheY phosphorylée agit sur la rotation du flagelle alors que CheB déméthyle le récepteur. CheR au contraire induit la méthylation. B) Quand le ligand se fixe sur son récepteur, CheA CheY et CheB sont inactives. CheR en méthylant le récepteur permet de décroître sa sensibilité à la substance.

III.D.1- Colonisation et invasion de l'hôte

III.D.1.a- Mobilité et chimiotactisme

La possibilité de se mouvoir et de s'orienter confère un avantage sélectif aux bactéries infectant l'hôte. Cet avantage sélectif inclut une meilleure efficacité pour trouver des nutriments, un échappement aux substances toxiques, la possibilité après colonisation de se localiser dans des niches écologiques préférentielles tels certains tissus de l'hôte et la possibilité de se disperser dans l'environnement pendant la transmission. La plupart des bactéries mobiles se déplacent grâce à des flagelles, appendices locomoteurs qui s'étendent à l'extérieur de la membrane plasmique (Figure 4). Le flagelle bactérien se compose de 3 parties : Le filament constitué de flagelline, le crochet constitué de différentes sous unités protéiques et le corps basal de structure plus complexe. Chez les Gram négatif, ce corps est constitué d'anneaux attachés à un axe central, les anneaux extérieurs L et P s'associent respectivement avec les lipopolysaccharides et le peptidoglycane, l'anneau M interne s'attache à la membrane plasmique.

La mobilité flagellaire résulte d'un gradient électrochimique dû au passage d'ions (H^+ ou Na^+) au travers de la membrane. Le moteur du flagelle est constitué d'au moins 10 protéines dont les anneaux décrits précédemment (Yorimitsu et Homma, 2001).

Le mouvement flagellaire est un processus complexe impliquant une cinquantaine de gènes et nécessitant une forte dépense énergétique (2% de l'énergie totale chez *E. coli*) ce qui implique un contrôle strict de sa synthèse et de son fonctionnement.

Le mouvement orienté des bactéries vers des substances attractives (éléments nutritifs) ou en sens opposé quand il s'agit de substances répulsives (déchets bactériens, substances nuisibles) est appelé chimiotactisme et constitue aussi un élément sélectif. Par exemple, certains tissus comme les épithéliums gastriques sont protégés de la colonisation bactérienne par la sécrétion de mucus par les cellules. Certaines bactéries comme *V. cholerae* ont la possibilité d'infiltrer ce mucus grâce à un flagelle et des facteurs chimiotactiques orientant la mobilité (Krukoniš et Dirita, 2003).

Les substances attractives ou répulsives sont détectées grâce à des chimiorécepteurs localisés dans l'espace périplasmique ou dans la membrane plasmique (Figure 5). Les chimiorécepteurs transmettent des signaux aux composants du système chimiosenseur qui contrôlent la mobilité flagellaire (Jurica et Stoddard, 1998).

L'organe émetteur de lumière chez le calamar *Euprymna scolopes* contient une population pure de bactéries luminescentes *V. fischeri* (Ruby, 1996). Dans cette relation symbiotique, l'organe luminescent protège l'hôte de ses prédateurs et la bactérie y trouve ses nutriments. L'établissement de la symbiose est extrêmement rapide. Au moment de l'infection, *Vibrio fischeri* présente une forte mobilité liée à la présence d'un flagelle. Vingtquatre heures après la colonisation, 95% des bactéries symbiotiques localisées dans l'organe luminescent de l'hôte ne possèdent plus de flagelle. Ce phénomène de répression de la synthèse du flagelle est réversible puisque la bactérie redevient mobile si elle estensemencée dans l'eau. Des mutants de *V. fischeri* ne possédant pas de flagelle ou possédant un flagelle inactif, ne sont plus capables de coloniser l'organe luminescent (Graf *et al.*, 1994).

Plus récemment, il a été montré que certaines substances présentes dans le mucus de l'organe luminescent d'*Euprymna scolopes* sont nécessaires à la migration de *V. fischeri* (DeLoney-Marino *et al.*, 2003). L'ensemble de ces résultats suggère que la mobilité et le chimiotactisme permettent à ce vibron de s'établir spécifiquement dans sa niche symbiotique.

Des mutants non mobiles de *V. anguillarum* ont été générés par transpositions et testés pour leur virulence *in vivo* (O'Toole *et al.*, 1996). Tous les mutants générés ne présentent plus de virulence par balnéation alors que la majorité des souches sont virulentes après injection. La caractérisation des cibles des transposons a montré qu'il s'agit d'homologues de gènes flagellaires identifiés chez d'autres entérobactéries (McGee *et al.*, 1996). Curieusement deux mutants ne présentent pas de virulence après balnéation ou injection. Chez un de ces mutants, le transposon est intégré dans le gène *rpoN*, dont le produit (facteur sigma 54) est nécessaire à l'expression des gènes de la mobilité mais aussi à d'autres facteurs de virulence (Kawagishi *et al.*, 1997). Un autre mutant codant pour une protéine FlaA délétée au niveau C-terminal ne présente aucune virulence (Milton *et al.*, 1996). Les auteurs proposent que la protéine FlaA tronquée n'est plus exportée du cytoplasme vers le filament et qu'elle régule ainsi négativement l'expression d'autres déterminants de virulence. Concernant le chimiotactisme, des souches mutées au niveau de l'homologue du gène *cheR* (Figure 5) ne présentent plus de virulence par balnéation et conservent leur pathogénie en injection (O'Toole *et al.*, 1996). L'ensemble de ces résultats démontre que dans ce modèle, la mobilité chimiotactique est un mécanisme de virulence clé permettant à la bactérie de traverser les barrières tégumentaires de l'hôte au moment de l'infection.

III.D.1.b- Adhérence et colonisation

Lors de la colonisation, un premier mécanisme mis en œuvre par la bactérie est l'adhésion à la surface des cellules de l'hôte. Deux mécanismes d'adhérence ont été décrits. L'un est dû aux pili qui sont des protéines fibrillaires membranaires interagissant le plus souvent avec des glycoprotéines ou glycolipides présents à la surface de la cellule hôte. L'autre mécanisme implique des adhésines qui sont des protéines non fibrillaires et permettrait une interaction plus durable entre la bactérie et la cellule cible.

Différents types de pili ont été identifiés chez *Vibrio cholerae*. Le TCP (toxin coregulated pili) est nécessaire à l'adhérence du vibron dans l'intestin (Taylor *et al.*, 1987 ; Tacket *et al.*, 1998). Le TCP est également le récepteur du bactériophage filamenteux CTX dont le génome code entre autre pour les toxines cholériques. La régulation de son expression est donc un facteur clé de la virulence de *V. cholerae* et sera développée plus loin. Un autre type de pili, le MSHA (mannose sensitive hemagglutinin pili) semble jouer un rôle dans ce mécanisme (Osek *et al.*, 1992). Des gènes homologues de l'opéron *tap* de *Aeromonas hydrophila* (*pilABCD*) ont été identifiés à partir de la séquence du génome complet de *V. cholerae* (Fullner et Mekalanos, 1999). Des expériences de mutagenèse ont montré que le gène *pilA* codant pour une pilin de type IV n'est pas nécessaire à la colonisation et à l'adhérence. D'autres gènes codant pour des facteurs d'adhésions ont été décrits, les *cep* (Core-encoded pili), *acf* (accessory colonisation factor) et *omp-U* (out membrane protein) (Pearson *et al.*, 1993; Parsos *et al.*, 1992; Sperandio *et al.*, 1995).

III.D.1.c- *Production d'enzymes hydrolytiques*

Beaucoup de bactéries pathogènes excrètent des enzymes hydrolytiques comme les protéases ou les hyaluronidases qui dégradent la matrice extracellulaire et donc l'organisation tissulaire au moment de l'invasion. Ces enzymes permettent aussi d'approvisionner la bactérie en source carbonée et donc en énergie. Ces enzymes ne tuent pas la cellule où ne modifient pas son fonctionnement, elles favorisent la colonisation où activent d'autres facteurs de virulence. Je les ai donc séparées du groupe des exotoxines même si l'injection de protéase purifiée peut être létale (Farto *et al.*, 2002).

Chez *V. cholerae* la métalloprotéase HprC active la sous unité de l'entérotoxine cholérique et dégrade la mucine intestinale pour faciliter l'action de la toxine cholérique (Booth *et al.*, 1984 Crowther *et al.*, 1987 ; Hase and Filkelstein, 1991). Chez *V. vulnificus*, la dégradation de collagène de type IV par la métalloprotéase EmpV est associée à des réactions hémorragiques (Chuang *et al.*, 1997, Miyoshi *et al.*, 1998). EmpA, métalloprotéase de *V. anguillarum* appartient à la même famille de protéines (Milton *et al.*, 1992), son expression est induite par le mucus intestinal chez le poisson (Denkin et Nelson, 1999). Un mutant de délétion du gène *empA* n'est plus virulent en balnéation alors qu'il garde sa virulence en injection.

III.D.1.d- *Invasion*

Afin d'échapper aux mécanismes de défense immunitaire, certaines bactéries secrètent une capsule en général constituée de polysaccharides (CPS). L'encapsulation a été clairement associée à la virulence de *Vibrio vulnificus* (Yoshida *et al.*, 1985 ; Simpson *et al.*, 1987). Plusieurs fonctions ont été associées à cette capsule. La prévention de la dessiccation favorise la transmission et la survie. L'adhérence à des supports où l'interaction cellule/cellule est impliquée dans la formation de biofilms et dans la colonisation de différentes niches écologiques. Le CPS peut être impliqué dans la résistance à l'immunité non spécifique avec en particulier une baisse de l'efficacité de la phagocytose due vraisemblablement à des répulsions électrostatiques. Chez les vertébrés le CPS peut être impliqué dans la résistance à l'immunité spécifique car les bactéries encapsulées sont moins immunogènes (Whitfield, 1988 ; Moxon et Kroll, 1990 ; Roberto, 1996).

III.D.1.e- *Les sidérophores*

Le fer est essentiel à la croissance bactérienne. Pour survivre la bactérie doit développer des mécanismes pour s'approvisionner en fer, présent sous forme libre en quantité très limitée. Le système le plus connu est appelé sidérophore. Ce sont de petites molécules qui chélatent le fer avec une haute affinité.

Un tel système été associé à la virulence de *V. anguillarum* (Crosa, 1980). Ce système est codé par un plasmide (pJM1). Il comprend un sidérophore, l'anguibactine (Actis *et al.*, 1986), et une protéine de la membrane externe, OM2 (Actis *et al.*, 1988), réceptrice du complexe anguibactin/fer.

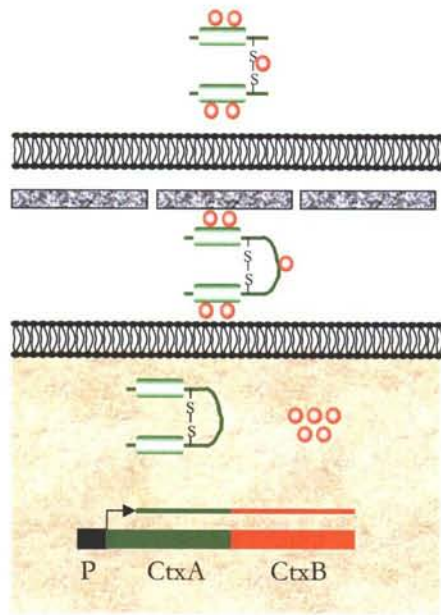


Figure 6: La toxine cholérique, expression, assemblage, excrétion. les sous unité A et B de la toxine cholérique sont codées par les gènes *ctxA* et *ctxB*, présents dans le même opéron. Les sites de fixation RBS de A et B sont distincts et la sous unité B est mieux traduite que A. Les sous unités A et B sont excrétées et assemblées dans le périplasma puis excrétées dans le milieu extracellulaire.

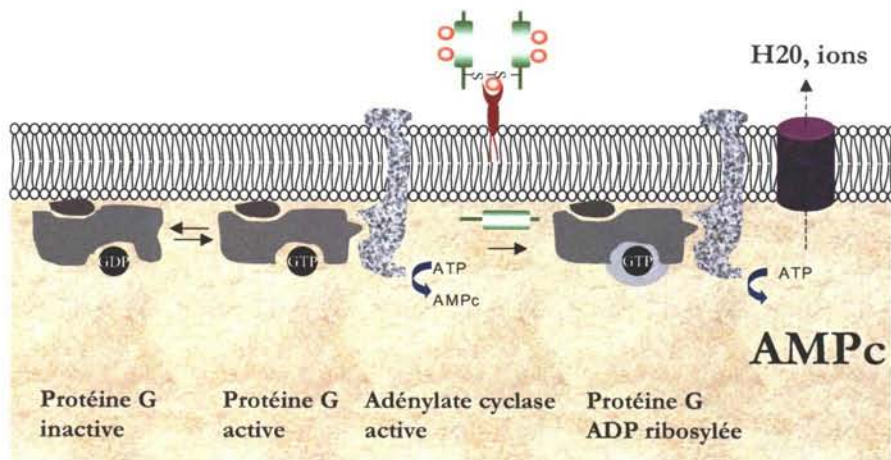


Figure 7: La toxine cholérique, action. Après fixation au récepteur GM1, la sous unité A est transloquée dans le cytosol ou elle est activée par réduction thiol dépendante. La sous unité ainsi tronquée, A1, catalyse l'ADP ribosylation d'une protéine G. L'activation de l'adénylate cyclase conduit à la libération d'AMPc, messenger intracellulaire ubiquiste. L'AMPc inhibe l'absorption active de NaCl et augmente la secrétions de chlore et bicarbonate.

III.D.2- Altération de l'hôte

La seconde catégorie de facteurs de virulence est constituée principalement de toxines altérant l'hôte. Ces altérations peuvent être de type lésions ou dysfonctionnement cellulaire.

III.D.2.a- Les exotoxines

Les exotoxines correspondent aux protéines bactériennes toxiques excrétées dans le milieu. Certaines toxines normalement présentes dans le cytoplasme ou le périplasma peuvent être libérées après lyse de la bactérie. Les exotoxines sont classées selon leur structure et leur mode d'action.

Les toxines A-B contiennent deux modules. L'un (B) se fixe au niveau d'un récepteur de la cellule hôte et détermine une spécificité d'action qui est plus ou moins large selon les toxines. L'autre module (A) constitue le site catalytique siège de la toxicité.

Dans le cas de *V. cholerae*, le module B se fixe à un récepteur spécifique, le GM1 ganglioside, présent à la surface des cellules épithéliales (Figure 6). Le module A catalyse l'ADP-ribosylation d'une protéine G aboutissant à l'activation de l'adénylate cyclase (pour revue voir Fishmann, 1990). L'augmentation d'AMPc intracellulaire entraîne une perte du contrôle du flux ionique et conduit à une perte passive d'eau par les cellules, caractéristique des symptômes du choléra (Figure 7).

D'autres toxines lysent les cellules en altérant l'intégralité des membranes. Chez *Vibrio parahaemolyticus*, l'hémolysine thermostable (*tdh*) forme des pores membranaires. (Honda *et al.*, 1992, 1993) D'autres toxines sont des phospholipases qui coupent le groupement phosphate chargé des phospholipides et donc déstabilisent la bicouche lipidique.

Un gène codant pour une protéine de la famille RTX (repeats in toxins) a été mise en évidence chez *V. cholerae* (Lin *et al.*, 1999 ; Heidelberg *et al.*, 2000). La production de RTX est associée à un arrondissement des cellules épithéliales sans lyse cellulaire, vraisemblablement via la dépolarisation des fragments d'actine du cytosquelette (Fullner et Mekalanos, 2000). Chez d'autres pathogènes ces protéines entraînent la lyse cellulaire en formant des pores membranaires

III.D.2.b- Les endotoxines

Par opposition aux exotoxines, les endotoxines regroupent les composés toxiques structuraux de la bactérie. Le lipopolysaccharide est un composant de la membrane externe des bactéries Gram négatif (Figure 8). Il est constitué de trois parties : le lipide A, le polysaccharide central (core) et la chaîne latérale O (Reidl et Klose, 2002). Le lipide A, portion toxique de la molécule, est enfoui dans la membrane externe tandis que le reste de la molécule est exposé à l'extérieur. L'activité toxique du LPS n'a donc lieu que quand la bactérie est lysée, soit après réponse immunitaire ou après certains traitements antibiotiques. La toxicité du LPS réside dans sa capacité à induire l'apoptose de cellules de l'hôte (Norimatsu *et al.* 1995 ; Foster *et al.*, 2000) et à sur-stimuler le système immunitaire (choc anaphylactique). Le LPS libéré dans le sang se fixe à une protéine soluble appelée « LPS binding protein, LBP » (Pugin *et al.*, 1996).

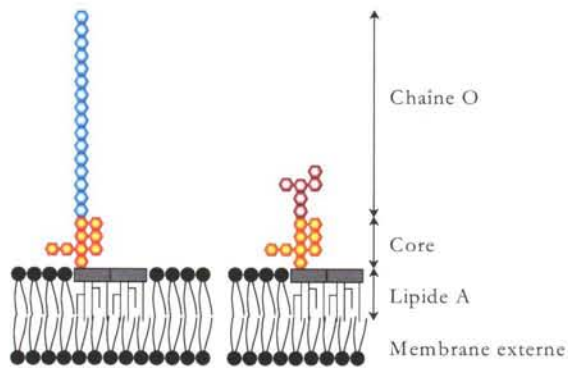


Figure 8: Structure du LPS. Exemple du LPS de deux sérogroupes de *Vibrio cholerae*. (à gauche O1, à droite O139), d'après Reidl et Klose, 2002.

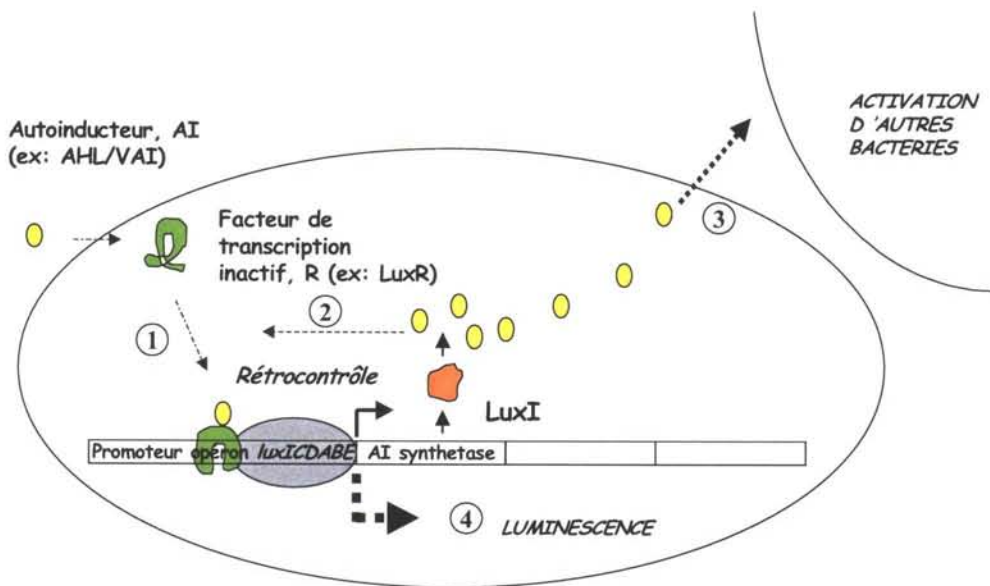


Figure 9: L'opéron Lux et la régulation de la luminescence chez *V. fischeri*. La phéromone active le facteur de transcription LuxR qui se fixe au promoteur de l'opéron Lux. Le premier gène de l'opéron code pour LuxI, une phéromone synthase. Il s'en suit un rétrocontrôle positif de l'opéron, une grande production de phéromone qui diffuse aux cellules voisines. L'expression des autres gènes de l'opéron permet l'émission de la luminescence.

Le complexe est alors capable d'interagir avec un récepteur de la famille Toll, qui stimule la voie d'activation NF- κ B/Rel. Ces facteurs de transcription sont impliqués dans les mécanismes du développement et la réponse immunitaire chez les vertébrés et invertébrés (Belvin et Anderson, 1996; Gerard, 1998). Une cascade de signalisation de type NF- κ B/Rel a été mise en évidence chez *C. gigas* (Escoubas *et al.*, 1999; Montagnani *et al.*, 2004) et plus récemment un gène codant pour une LBP vient d'être mis en évidence à partir de banque EST de *C. gigas* (E. Bachère, pers. com.).

Chez *Vibrio cholerae*, d'autres composés structuraux que le LPS (Nesper *et al.* 2001; Waldor *et al.*, 1994) ont été associés à la virulence, ce sont les porines OmpU et OmpT (Miller et Mikalanos, 1988).

III.D.3- Régulation

Les bactéries pathogènes sont confrontées à des variations environnementales importantes. Les souches de vibron que nous étudions au laboratoire sont trouvées dans différentes niches écologiques : océan, estuaire, sédiment, éclosion, poissons d'élevage, mollusques. Chez l'hôte infecté on peut les isoler de différents compartiments anatomiques plus ou moins agressifs comme la glande digestive, la gonade ou l'hémolymphe. Il est évident qu'un grand nombre de facteurs externes affectent l'expression de la virulence. Cette capacité à réguler les gènes de virulence confère aux bactéries pathogènes un avantage sélectif certain (Mekalanos 1992). Un premier niveau de régulation se situe au niveau du génome par la présence ou l'amplification du gène (voir plasticité du génome page 43) ou par des mécanismes de réarrangement génique (mutation, variation de phase, variation antigénique) que je n'aborderai pas ici (Salysers et Whitt, 1994). La régulation de l'expression de gènes de virulence peut se faire au niveau de la quantité des messagers ou protéines par des mécanismes transcriptionnels ou post-transcriptionnels. Enfin la maturation de protéines (modification covalente, clivage, export) peut également intervenir.

Chez les procaryotes l'ADN est associé à des protéines voisines des histones pour former une structure appelée nucléoïde ne semblant pas impliquer une régulation des gènes au niveau conformationnel. Struhl en 1999 définit l'activité basale des promoteurs chez les procaryotes comme un phénomène non restrictif. L'ARN polymérase se fixe directement au promoteur via une séquence spécifique située en amont du site d'initiation de la transcription. Répresseurs et activateurs agissent donc essentiellement au niveau de l'activité de cette polymérase au contraire de ce qui existe chez les eucaryotes où un contrôle de l'accessibilité du promoteur par les protéines de la chromatine renforce la répression de son activité.

Une autre différence fondamentale entre procaryote et eucaryote est liée au fait que chez les bactéries de nombreux gènes sont organisés en opérons c'est à dire que leur expression est régulée par un promoteur unique à partir duquel un ARN polycistronique est transcrit. L'exemple de l'opéron *lux*, contrôlant la luminescence quorum sensing-dépendante chez *Vibrio fischeri* est détaillé figure 9.

D'autres gènes, organisés en régulon, sont situés dans des locus différents mais sont contrôlés par des régions promotrices répondant aux mêmes protéines régulatrices.

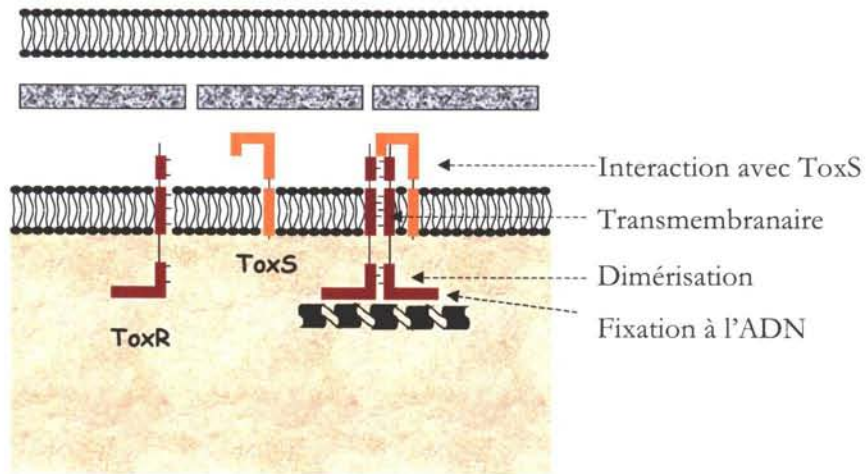


Figure 10: Régulation et fonction de ToxR. La protéine ToxR de *Vibrio cholerae* est un transactivateur majeur de promoteurs contrôlant l'expression de gènes de virulence. Le produit du gène ToxS, situé dans le même opéron que ToxR module l'activité de ce transactivateur (d'après Dirita et Mekalanos, 1991).

Par exemple, chez *V. cholerae*, le produit du gène *toxR* joue un rôle central dans la régulation coordonnée de la transcription de plusieurs gènes de virulence codant pour la toxine cholérique (*ctx*), un pili (*tcp*), un facteur d'adhésion (*acf*) et des protéines membranaires (OmpU et OmpT). ToxR régule aussi l'expression d'un autre facteur de transcription ToxT (Betley et al., 1986 ; Miller et al., 1987, DiRita, 1992). L'activité de ToxR est régulée par la protéine ToxS (Figure 10). Ainsi le régulon ToxR intervient dans une régulation complexe de l'expression de gènes de virulence.

Le système ToxR/S est impliqué dans la régulation de *tdh* chez *V. parahaemolyticus* (Lin et al., 1993) et du gène de l'hémolysine et d'OMP chez *V. vulnificus* (Lee et al., 2000).

Chez *Vibrio anguillarum* le gène *toxR* ne semble pas impliqué dans la virulence alors qu'ils contrôlent l'expression de protéines membranaires (Okuda et al., 2001). Ce gène semble présent chez plusieurs espèces de vibrions pathogènes ou non. Ces résultats confortent l'hypothèse d'un rôle ancestral de ToxR dans la régulation de gènes bactériens dont les OMP (Champion et al, 1997).

III.D.4- Quorum sensing

Depuis une dizaine d'années un grand nombre de travaux ont montré l'existence d'une communication cellulaire entre bactéries, contrôlée par la densité cellulaire et régulant des fonctions biologiques importantes comme la bioluminescence, la sporulation, la conjugaison, la virulence ou la formation de biofilms (Kaprelyants et Kell, 1996 ; Wirth et al., 1996 ; Davies et al., 1998 ; Fuqua et Greenberg, 1998 ; Bassler, 2002) . Cette « action concertée » des procaryotes ou « quorum sensing » est médiée par des molécules autocrines diffusibles appelées phéromones ou autoinducteurs. Il conduit à l'activation de l'expression de certains gènes, à la base de fonctions physiologiques spécifiques.

Chez les bactéries Gram négatif les phéromones décrites jusqu'à présent appartiennent au groupe des homosérines lactone (AHL) qui divergent au niveau de leur chaîne acyl (substituant en C3 et longueur). Chez les bactéries Gram positif, les phéromones caractérisées jusqu'à présent correspondent à des γ -butyrolactones ou à des peptides.

Le modèle le mieux décrit dans la littérature est celui de la bioluminescence chez *Vibrio fischeri* (Figure 9). Une haute densité cellulaire est nécessaire à l'émission de luminescence par cette bactérie. La quantité d'AHL (OHHL) produite par les bactéries dans le milieu est proportionnelle à la densité cellulaire. OHHL se fixe à un facteur de transcription appelé LuxR, ce complexe active alors le promoteur de l'opéron *luxICDABE*. Le gène codant pour l'autoinducteur synthase LuxI est le premier gène transcrit dans cet opéron. Il y a alors augmentation de LuxI synthase, d'où l'augmentation d'OHHL et autorégulation de la quantité de phéromone. Cette dernière diffuse passivement à travers la membrane bactérienne et peut ainsi activer les cellules voisines. Ainsi au moment où la concentration de phéromone atteint un seuil critique, l'opéron *lux* est activé conduisant à l'expression des gènes impliqués dans la bioluminescence.

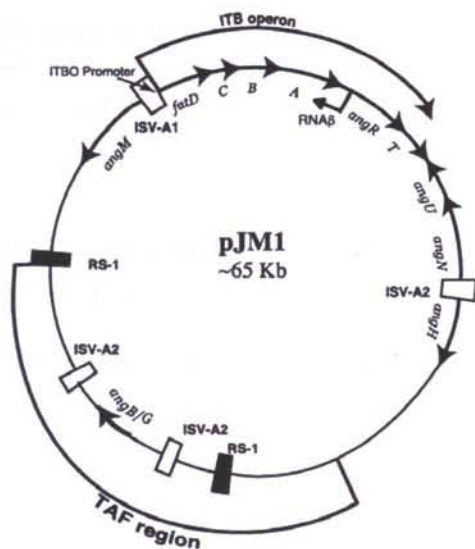


Figure 11: Le plasmide pJM1 de *Vibrio anguillarum*. Ce plasmide porte les gènes permettant à la bactérie de survivre en conditions limitées en fer (opéron ITBO). Les protéines codées par ang B/G, M, N, R et T sont impliquées dans la biosynthèse du sidérophore anguibactine. Les protéines codées par fat A, B, C, et D permettent l'internalisation du complexe fer-sidérophore dans le cytosol. Cet opéron est hautement régulé par des facteurs codés au niveau chromosomique (Fur) ou plasmidique (AngR) (d'après Crosa et al., 1980).

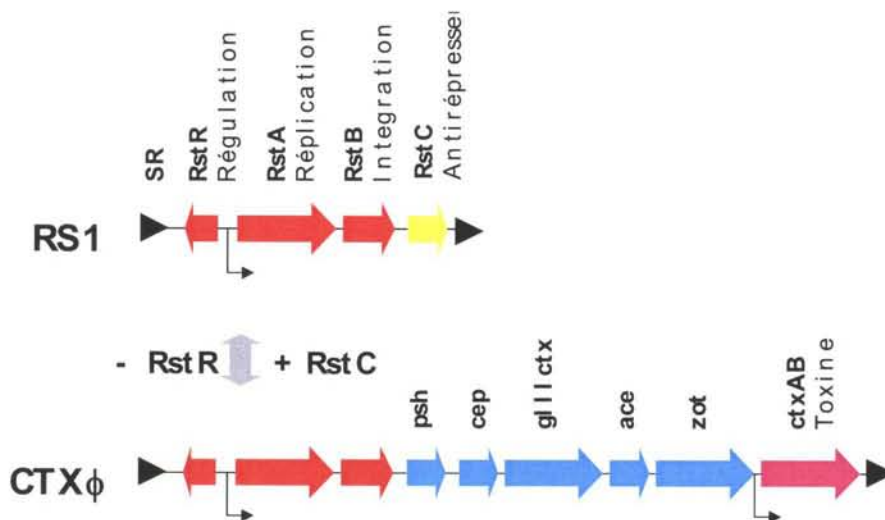


Figure 12: Structure des phages RS1 et CTX. Les flèches indiquent le sens de la transcription; SR: Séquence répétée dans génome de cholerae qui encadre le prophage; En rouge: gènes quasi identiques entre les deux phages; en bleu: gène contrôlant l'encapsidation ou la sécrétion; en jaune ou rose: gènes spécifiques. RstR réprime l'expression des gènes du cycle productif des phages. RstC inactive ce répresseur ce qui conduit à la production de virion.

Des études récentes ont permis d'identifier une super famille de gènes LuxR et Lux I ainsi que les AHL correspondant dans diverses espèces bactériennes comme : *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia stewartii*, *Yersinia enterocolitica*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter agglomerans*, *Rhizobium leguminosarum*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que d'autres espèces de vibron comme *V. harveyi* et *V. anguillarum* dont certaines souches sont pathogènes. En parallèle un certain nombre de biosenseurs, permettant la détection d'AHL, ont été obtenus. Par exemple, *Chromobacterium violaceum* est une bactérie Gram négatif aquatique qui produit un pigment violet caractéristique. Une souche violacein-négative (CV026) a été obtenue par recombinaison avec un mini-transposon. La production de pigment peut être réactivée en incubant ce mutant en présence de surnageant de culture de la souche sauvage ou de certains AHL purifiés. Ce biosenseur semble spécifique des AHL à chaîne courte (C4 à C8). D'autres biosenseurs permettent la détection d'AHL à longue chaîne.

III.D.5- Plasticité génomique

La résistance aux antibiotiques ou la virulence peut être considérée comme une fonction adaptative à une pression de sélection dans une même niche écologique (Rowe-Magnus et Mazel, 2001). Comme pour d'autres capacités adaptatives les mécanismes de virulence ou de résistance proviennent le plus souvent d'éléments génétiques exogènes. Ces fragments correspondent soit à des éléments mobiles (plasmides conjugatifs ou mobilisables, bactériophages ou transposons) ou à des intégrons. L'acquisition d'ADN exogène peut se faire par transformation (l'ADN provient de l'environnement), par transduction (infection par un bactériophage) ou par conjugaison. Dans ce dernier cas le transfert d'ADN d'une bactérie à l'autre se fait via un pore au niveau des deux membranes fusionnées.

III.D.5.a- Les plasmides

Les plasmides sont les éléments conjugatifs les mieux étudiés. Ils contiennent un certain nombre de gènes nécessaires au procédé de conjugaison (gènes *tra*) et en conséquences ont une taille d'au moins 25 kbp. Ces plasmides peuvent acquérir et transmettre plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques et conférer une virulence aux bactéries. En particulier, chez *V. anguillarum*, le plasmide pJM1 porte des gènes codant pour un sidérophore, en partie responsable de la virulence de cette bactérie (Crosa et al., 1980) (Figure 11).

III.D.5.b- Les phages

Certains phages permettent la transmission de gènes de virulence horizontalement et verticalement. Par contre ils sont rarement impliqués dans le transfert de gènes de résistance (Rowe-Magnus et Mazel, 2001). Chez *V. cholerae*, les principaux gènes de virulence : *ctx* et *tcp* proviennent de transferts horizontaux (Mekalanos, 1983 ; Davies et Waldor, 2003). Certains gènes comme *ctx* sont contenus dans le génome du phage filamenteux CTX ϕ (Waldor et Mekalanos en 1996). L'expression des gènes et la transmission de ce phage sont contrôlées par un anti-répresseur : RstC, lui-même codé par un autre phage, RS1, satellite de CTX ϕ (Davis et al., 2002). Le gène *tcp* code pour un pili responsable de l'adhésion du vibron aux cellules épithéliales mais aussi récepteur du phage CTX ϕ . Ce gène, localisé dans une région appelé îlot de pathogénie, pourrait être associé lui aussi à un bactériophage (Figure 12).

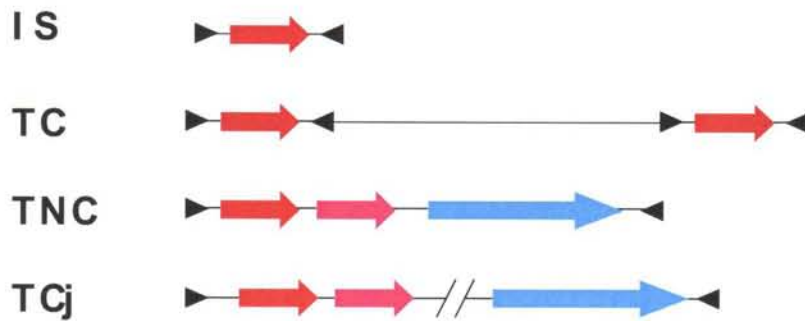


Figure 13: Structure de certains éléments transposables chez les procaryotes. *Les éléments d'insertions* (IS) se caractérisent par leur petite taille (750 à 2500 pb), sont bordés par des séquences inversées et codent uniquement pour les fonctions de transposition; Dans les *transposons composites* (TC), deux IS ont collaboré pour mobiliser une séquence située entre eux; Les *transposons non composites* (TNC) ne comportent pas d'IS aux extrémités, codent pour leur fonction de transposition et divers déterminants auxiliaires comme la résistance aux antibiotiques; *les transposons conjugatifs* (TCj) sont de grande taille (16 à 60 kpb) codent pour leur fonction de transposition et divers résistance aux antibiotiques et sont transmis non seulement verticalement (transposition) mais aussi horizontalement (conjugaison).

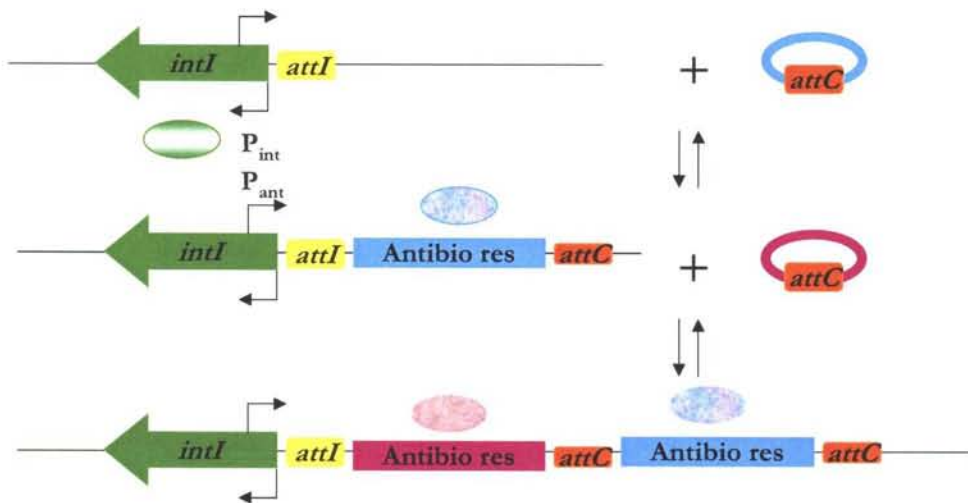


Figure 14: Modèle d'échange de cassette d'après Rowe-Magnus et Mazel, 1999. Dans l'intégron le promoteur P_{int} contrôle l'expression d'une intégrase qui va catalyser l'insertion de la cassette contenant le gène de résistance à l'antibiotique au niveau du site $attI$ en aval du promoteur P_{ant} . Plusieurs cassettes peuvent ainsi être intégrées l'une après l'autre (d'après Rowe-Magnus et Mazel, 1999).

III.D.5.c- *Les transposons*

Les éléments transposables sont des séquences d'acides nucléiques capables de mobilité chez les procaryotes et chez les eucaryotes. Ils permettent la translocation d'informations génétiques au sein d'un réplicon donné, entre réplicon d'une même cellule ou de cellules distinctes (Catherine Turlan, 1996). Il en résulte des modifications structurales (délétions, inversions) ou géniques (activation ou inactivation). Les éléments transposables, souvent présents en plusieurs exemplaires chez l'organisme hôte, sont autant de substrats pour la machinerie de recombinaison homologue. Ils permettent donc de transformer transitoirement ou définitivement le patrimoine génétique et contribuent de façon substantielle à la diversité et à l'évolution des organismes. La survie d'un élément transposable résulte d'un équilibre entre l'impact délétère de réarrangement génétique qu'il entraîne et la source d'adaptabilité qu'il représente pour l'organisme hôte.

Chaque élément transposable code pour sa propre recombinase (transposase ou intégrase), une enzyme qui possède une double activité clivage/ligation. D'un point de vue structural, les éléments transposables sont extrêmement variés (Figure 13).

III.D.5.d- *Les intégrons*

Les intégrons ne sont pas définis comme des éléments mobiles mais comme des éléments de capture de fragments exogènes. Ce sont des systèmes naturels de clonage et d'expression qui, sous le contrôle d'une intégrase, incorporent des « cassettes » pour les convertir en gènes fonctionnels (Rowe-Magnus et al., 1999 ; 2001). Les cassettes sont des séquences constituées d'un cadre de lecture associé à un site de recombinaison *attC* (Figure 14). L'intégron est constitué du gène (*intI*) et de son promoteur P_{int} respectivement codant et régulant une intégrase, d'un site primaire de recombinaison *attI*, d'un promoteur fort P_{ant} situé en amont du site *attI*.

Les intégrons multirésistants contiennent des cassettes constituées de gènes de résistances aux antibiotiques. Une autre classe d'intégron, le super-intégron, a été mise en évidence chez *Vibrio cholerae* (Mazel et al., 1998). Il diffère par sa taille (179 cassettes chez *V. cholerae*, 3% du génome) et une grande hétérogénéité des sites *attC*. Par la suite, des super-intégrons ont été mis en évidence chez d'autres espèces de vibron (*V. mimicus*, *V. metschnikovii*, *V. parahaemolyticus* et *V. fischeri*) mais aussi chez d'autres genres bactériens comme *Pseudomonas* ou *Shewanella* (Latéfa Biskri, 2003). La majorité des cassettes des super-intégrons portent des gènes auxquels aucune fonction n'a pour le moment été assignée, une minorité code pour des fonctions adaptatives très variées dont des facteurs de virulence et des résistances aux antibiotiques.

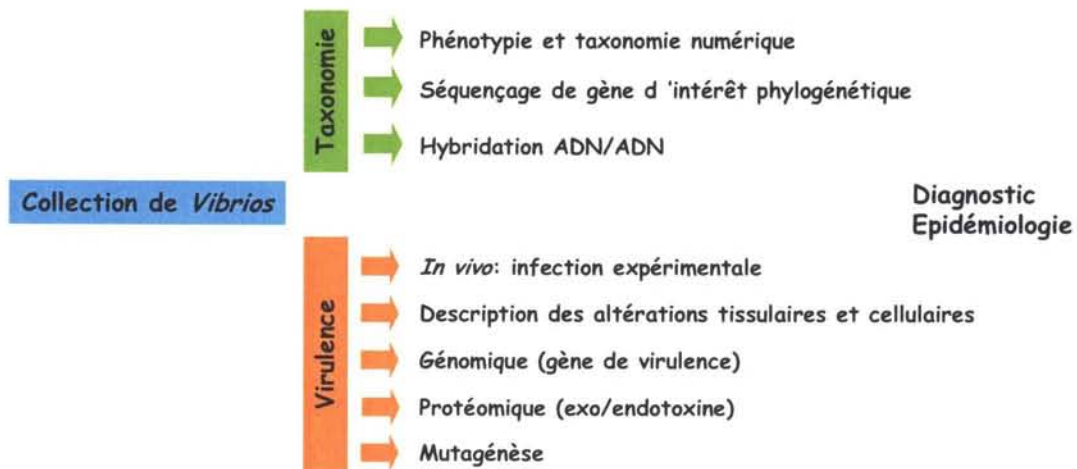


Figure 15: Objectifs de mon projet de recherche

III.E- Projet de recherche

III.E.1- Objectifs

L'émergence de nouvelles vibrioses associées à des mortalités d'animaux marins est un sujet préoccupant en raison des pertes économiques qu'elle implique et du manque de connaissances fondamentales sur ces pathogènes (Harvell et al., 1999). Au vu des missions de l'Ifremer, quelles doivent être les axes de recherche prioritaires et quels sont les moyens de lutte envisageables ?

On veut pouvoir détecter:

*** *l'agent infectieux.*** Dans le cas des vibrions une double approche est nécessaire : 1) identification taxonomique (recherche d'espèces à risque) 2) caractérisation des supports de virulence (sélection des souches virulentes)

*** *les symptômes caractéristiques de vibrioses.*** Des symptômes caractéristiques (exemple de l'anneau brun) peuvent orienter les recherches vers un agent étiologique spécifique (*V. tapetis*). Un tableau clinique des lésions associées à une souche virulente requiert au préalable un système d'infection expérimental et un stock d'animaux sains indemnes. Le lien de cause à effet devra être démontré sur le terrain par une étude épidémiologique.

On veut pouvoir intervenir:

*** *sur le pathogène :*** en évitant sa dispersion et sa transmission

*** *sur l'hôte :*** en évitant qu'un animal « sensible » soit au contact d'un vibriion opportuniste ; cette sensibilité peut être estimée/contrôlée par une approche physiologique ou génétique.

*** *Sur l'environnement :*** Des facteurs environnementaux peuvent influencer la virulence du vibriion ou la résistance de l'hôte; uniquement dans le cas des écloséries, on pourra utiliser des agents antibactériens (antibiotiques, probiotiques).

Dans ce contexte, les objectifs de mon projet de recherche sont donc :

- i) de clarifier la taxonomie des vibrions isolés d'huîtres subissant des épisodes de mortalité
- ii) de sélectionner un (des) isolat(s) pour développer un modèle expérimental de vibriose chez l'huître creuse *C. gigas*
- iii) de décrire au niveau cellulaire et moléculaire les mécanismes de pathogénicité
- iv) de mettre au point des tests de diagnostic spécifiques de souches virulentes (biotests, sondes moléculaires).

III.E.2- Résultats préliminaires

Une première étude portant sur l'identification de bactéries pathogènes d'huître creuse a été conduite par Magalie Waechter dans le cadre de son travail de thèse de 1997 à 2000. Cette thèse a été financée par l'écloserie Graine Océan (bourse CIFRE). Dès mon arrivée au laboratoire, j'ai encadré la partie moléculaire de ce travail. Ce travail a donné lieu à deux publications (Waechter et al., 2002 ; Le Roux et al., 2002)

Des souches bactériennes isolées lors d'épisodes de mortalité estivale ont d'abord été caractérisées biochimiquement. Parmi ces bactéries, la souche de *Vibrio splendidus* biovar II s'est révélée pathogène de naissain en condition expérimentale. L'identification génotypique de cette souche, TNEMF6, basée sur une phylogénie 16S a confirmé son appartenance à *Vibrio splendidus* (Waechter et al., 2002). Cette souche a ensuite été recherchée lors d'autres épisodes de mortalité. A cette fin, la flore vibrionacée d'animaux sains ou moribonds a été isolée et les souches apparentées à *V. splendidus* biovar II ont été sélectionnées. Une comparaison des souches a été effectuée par phénotypage (39 tests biochimiques) et génotypage (ribotypage, PCR-RFLP 16S, *rpoD* et *gyrB*). Les proximités génomiques ont été confirmées par hybridation ADN/ADN. Seule la souche TNNIII7 parmi une centaine de souches isolées, est proche de la souche pathogène (taux d'hybridation ADN-ADN 92%). Contrairement à la souche TNEMF6 cette souche ne semble pas pathogène en infection expérimentale chez l'huître ou la palourde (Le Roux et al, 2002).

Les résultats de ces travaux sont à l'origine du projet actuel. Dans le cas des souches apparentées à *V. splendidus* les outils de classification des vibrions (tests biochimiques et clés de détermination proposés par Alsina et Blanch, 1984) se sont révélés non adaptés en raison de la variabilité/versatilité des phénotypes et du nombre important d'espèces de vibron en cours de description (50 espèces décrites en 2000, plus de 70 en 2004!). Une clarification de la taxonomie, basée sur une approche polyphasique (phénotypage et génotypage) apparaît aujourd'hui nécessaire. L'étude de gènes d'intérêt phylogénétique codant pour des protéines comme la gyrase (*gyrB*) ou le facteur sigma (*rpoD*) devraient permettre une meilleure discrimination des souches apparentées à *V. splendidus*.

L'indication donnée par les marqueurs taxonomiques ne permet pas de conclure sur les potentialités pathogéniques des souches. L'infection expérimentale est donc actuellement le seul moyen de définir la virulence des isolats. Or chez les mollusques il n'existe pas de lignée génétiquement pure élevée en milieu contrôlé, ce qui engendre des problèmes de reproductibilité expérimentale. D'autre part, il n'existe pas de culture cellulaire de mollusques en lignée continue. Seuls quelques types cellulaires (hémocytes, cellules cardiaques, cellules embryonnaires) peuvent être prélevés et maintenus quelques jours en culture (Cadoret et al., 1999 ; Le marrec Croq et al., 2000). Nous ne disposons donc pas, aujourd'hui, de biotests standardisés pour évaluer la pathogénicité des isolats. Pour ce qui est de la détection de gènes supports de virulence, les données actuelles reposent sur un nombre restreint de pathogènes, la plupart infectant l'homme. Chez ces vibrions, l'apparition de symptômes cliniques, la disponibilité de modèles expérimentaux et d'outils de génétique (mutagenèse) a permis la caractérisation de gènes responsables de la virulence.

Enfin, en ce qui concerne les épisodes de mortalités estivales, nous confirmons que ce syndrome ne peut résulter de l'intervention d'une unique souche de vibrion (épizootie). Par contre nos résultats, ainsi que ceux de l'équipe de Serge Poulet à Roscoff (Lacoste et al., 2001), suggèrent que des bactéries appartenant à ce genre, voire à l'espèce *V. splendidus*, jouent un rôle dans le développement d'une maladie opportuniste responsable de certains des épisodes de mortalité anormale observés en été.

III.E.3- Origine de la collection de vibrions

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre du Doctorat de M. Gay et ont fait l'objet d'une publication (Gay et al., 2004a)

Au cours de l'été 2001, des animaux vivants collectés au voisinage d'huîtres creuses subissant des mortalités estivales et provenant de différents sites géographiques ont été placés en aquarium avec des animaux de l'écloserie de l'Ifremer (sains) pour des expériences de cohabitation. Dans 9 cas sur 12 une transmission du syndrome « mortalité » a été observée laissant supposer une origine infectieuse au phénomène. Dans 6 de ces 9 cas de transmission de la maladie, l'autre agent infectieux décrit comme associé aux mortalités estivales, le virus herpès OHV, n'a pas été détecté. Un isolement de la flore vibronacée a été effectué à partir d'hémolymphe d'huîtres moribondes issues des 6 expériences sélectionnées précédemment ou d'huîtres saines provenant d'écloserie. Quatre colonies de chaque type morphologique ont été prélevées au hasard et repiquées deux fois pour purification des souches. Nous avons ainsi isolé 125 souches de vibrion, 82 isolées d'animaux malades et 43 isolées d'animaux sains.

En raison du grand nombre de souches à étudier, un premier criblage a été effectué en regroupant par 4 des souches isolées d'une même expérience de cohabitation. Ces groupes de souches ont été injectés dans le muscle adducteur de palourdes puis d'huîtres creuses (au total : 4.10^7 CFU). Seize souches (4 groupes de 4) ont ainsi été sélectionnées pour un second criblage chez l'huître ce qui a permis de les classer en trois catégories selon le taux de mortalité cumulée obtenus au bout de 3 jours: virulence faible (<10%, n=2), virulence moyenne (n=12), virulence forte (>50% ; souches 15 et 35). Curieusement, certaines souches injectées deux à deux (2.10^7 CFU+ 2.10^7 CFU) entraînent un plus fort taux de mortalité que l'injection de l'une ou l'autre souche. Par ailleurs, un cas d'antagonisme entre deux souches a été mis en évidence.

III.E.4- Taxonomie

III.E.4.a- Choix d'une approche polyphasique

Ce travail a été effectué en collaboration avec Jean Louis Nicolas au LPI de Brest et a fait l'objet d'une publications, (Le Roux et al., 2004)

De nombreuses souches identifiées comme des *Vibrio splendidus* ont été associées à des infections d'espèces aquacoles. Cependant une grande diversité génotypique laisse supposer que ces souches appartiennent à différentes espèces (Le Roux et al., 2002). La description récente de quatre nouvelles espèces proches phénotypiquement de *V. splendidus*, étaié cette hypothèse (Macian et al., 2001 ; Thompson et al., 2002, 2003a, b).

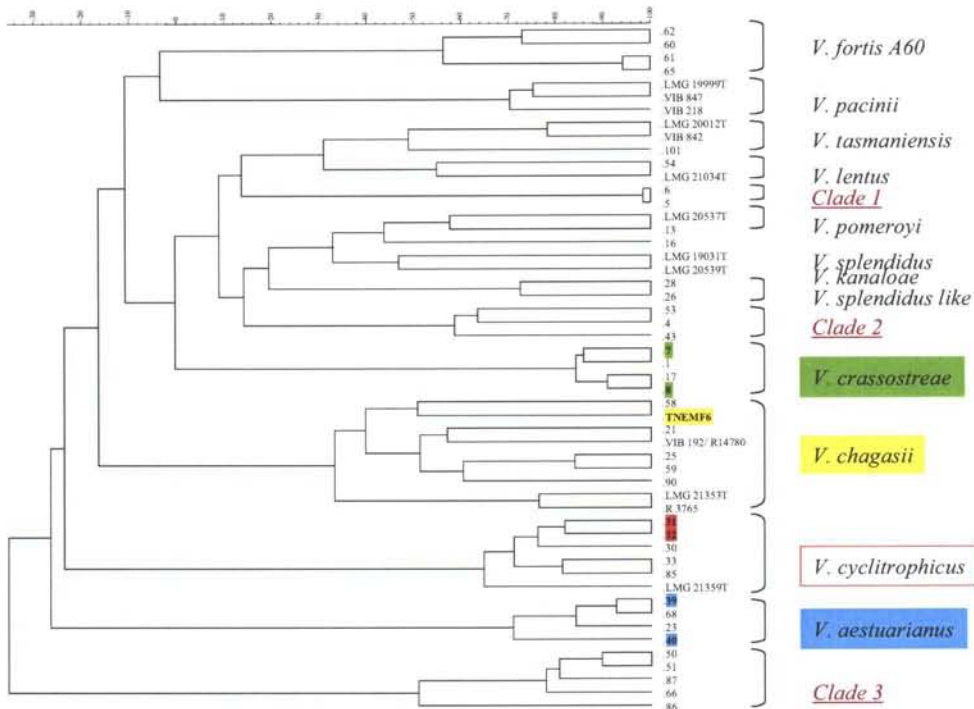


Figure 16: Dendrogramme des profils AFLP de 40 souches de notre collection (F. Thompson, 2003)

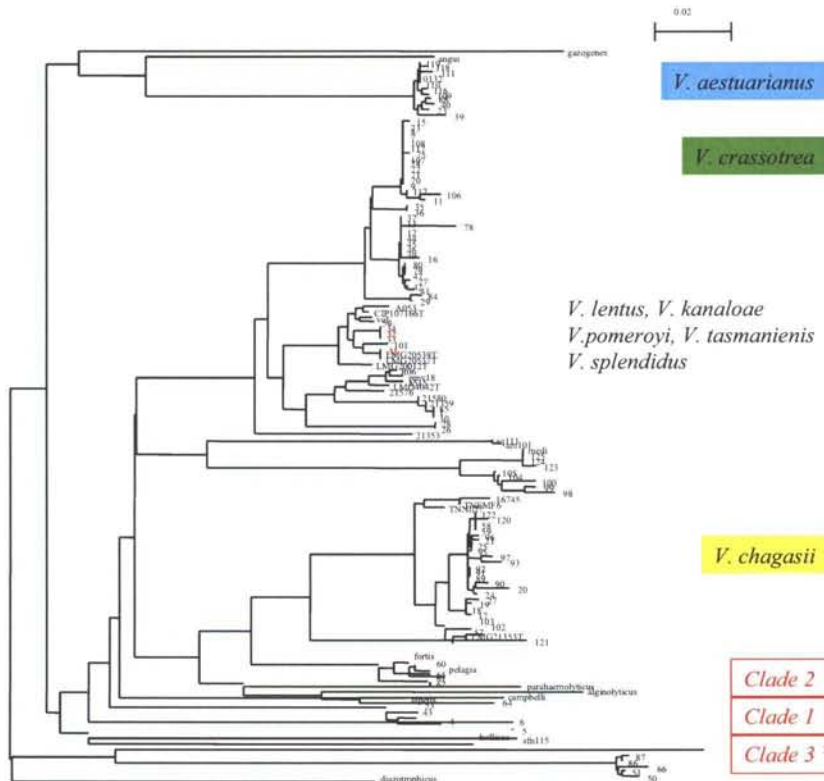


Figure 17: Arbre phylogénétique obtenu après alignement de séquences partielles gyrB

Treize souches isolées lors d'épisodes de mortalité d'huîtres, de coquille Saint Jacques ou de turbot ont été initialement identifiées comme appartenant à l'espèce *V. splendidus*. Nous avons caractérisées ces souches par une approche polyphasique, approche caractérisée par une combinaison des analyses des phénotypes et des génotypes (Le Roux et al., 2004). L'analyse phénotypique est basée sur 80 tests biochimiques et les résultats sont analysés en taxonomie numérique (matrice de distance) ce qui permet de réaliser un dendrogramme regroupant des phénotypes. Dans cette analyse les 13 souches isolées d'animaux malades et les souches type des espèces *V. lentus*, *V. chagasii*, *V. kanaloae*, *V. pomeroiyi*, *V. tasmaniensis* montrent 80% de similitude avec la souche type de *V. splendidus*. Une analyse phylogénétique a été entreprise sur la base d'alignements de séquences du gène codant pour la petite sous unité ribosomique (16S) ou codant pour la sous unité B de la gyrase et (*gyrB*). Le gène 16S de ces souches ne permet pas leur attribution claire à une espèce en raison d'une trop forte similitude des séquences. De plus, la variation de séquence entre cistron dans un même génome est similaire à la variation interspécifique. Seules les souches appartenant à l'espèce *V. chagasii*, incluant TNEMF6 et TNNNIII7 initialement identifiées *V. splendidus* biovar II, peuvent être séparées des autres espèces avec de bonnes valeurs de bootstraps. Ce résultat a d'ailleurs été confirmé au LMG de Gand par AFLP (Figure 16).

La phylogénie basée sur les séquences du gène *gyrB* permet une meilleure séparation des espèces *V. chagasii*, *V. splendidus* et *V. lentus*. Les résultats obtenus sont congruents avec les taux d'hybridation ADN-ADN, qui restent le critère de référence en taxonomie bactérienne. Par contre cette approche phylogénique ne permet pas de séparer les espèces *V. kanaloae*, *V. pomeroiyi* et *V. tasmaniensis*, initialement décrites par AFLP et confirmées par des expériences d'hybridation ADN-ADN (Thompson et al., 2003a, b).

Dans le cadre d'une collaboration avec C. Paillard (UBO Brest) et Jean Louis Nicolas (Ifremer Brest) des souches proches respectivement de *V. tapetis* et *V. aestuarianus* ont été analysées par une phylogénie *gyrB* et hybridation ADN-ADN. Les résultats confirment une congruence entre ces deux approches.

III.E.4.b- Identification taxonomique des souches isolées d'huîtres creuses subissant des épisodes de mortalité

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre du Doctorat de M. Gay (Gay et al., 2004a)

Les 125 souches isolées de *C. gigas* après transmission des mortalités par cohabitation ont été partiellement caractérisées par phénotypage (31 tests biochimiques) et génotypage (séquençage partiel du gène *gyrB*, Figure 17). Cette étude a montré que la majorité des vibrions isolés d'animaux sains ou malades sont apparentés au groupe polyphylétique des *V. splendidus*. Certaines espèces comme *V. mediterranei*, n'ont été détectées que chez des animaux sains (Gay et al., 2004a). En ce qui concerne les souches virulentes sélectionnées par infection expérimentale, 14 d'entre elles appartiennent au groupe *V. splendidus*. Les isolats 7, 8, 13, 14, 15, 16 sont regroupés dans un clade ne contenant pas de souche type. Ces isolats appartiennent donc probablement à une, voire deux, nouvelle(s) espèce(s). La souche 30 appartiendrait à l'espèce *V. splendidus* alors que les isolats 31, 32, 33, 34 sont regroupés dans un clade contenant les souches type des espèces *V. lentus*, *V. kanaloae*, *V. pomeroiyi* et *V. tasmaniensis*.

Les profils AFLP des souches 31 et 32 laissaient supposer qu'elles appartiennent à l'espèce *V. cyclitrophicus* (Figure 16) ce qui remettait en cause les résultats obtenus en phylogénie. Des expériences d'hybridation ADN-ADN ont donc été menées afin de clarifier la position taxonomique de ces deux souches (Gay et al., 2004b). Le résultat de cette analyse reste difficile à interpréter puisque les deux souches présentent des taux d'hybridation >80% avec les souches types d'espèce *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis* et *V. kanaloae*.

III.E.4.c- Description de *Vibrio crassostreae*

Ce travail a été effectué en collaboration avec Fabiano Thompson du Laboratoire de microbiologie de Gand (LMG), et a fait l'objet d'une publication (Faury et al., 2004)

La position taxonomique des isolats 7, 8, 15, 107, 108 a été précisée par une approche polyphasique (Faury et al., 2004). Sur la base des gènes 16S ces isolats apparaissaient proches de *V. splendidus* alors que la phylogénie *gyrB*, les profils AFLP et les expériences d'hybridation ADN-ADN concordent pour définir ces souches comme appartenant à une nouvelle espèce, que nous avons nommé: *Vibrio crassostreae*. Cette nouvelle espèce est particulièrement bien représentée dans notre collection de souches isolées d'huîtres creuses malades ou saines.

III.E.4.d- Autres espèces en cours de caractérisation

*Ce travail est en cours au LGP (16S, *gyrB*, phénotypie) en collaboration avec F. Thompson au LMG (AFLP, hybridation ADN-ADN, profils lipidiques).*

Lors de la comparaison des approches AFLP et *gyrB* pour l'identification de 40 souches de notre collection nous avons repéré 3 clades ne contenant pas de souche type (Figure 16 et 17). Ces souches pourraient correspondre à de nouvelles espèces en cours de description.

III.E.4.e- Le Centre de Ressource Biologique du LGP la Tremblade

Action concertée CNRS/Ifremer/Ministère de la recherche ; collaborations Ifremer-LGP, La Tremblade ; CNRS-LEMAR, Brest ; Ifremer-LPI, Brest ; Ifremer-LAC, Nouvelle-Calédonie.

L'élaboration d'une collection de vibriens pathogènes d'organismes marins (mollusques, crevettes, poissons), caractérisée en terme de spéciation et de virulence est une étape clé de nos projets de recherche et constitue un travail tout à fait innovant. Cet outil de référence favorisera une démarche expérimentale commune pour l'étude et la comparaison des vibrioses chez ces animaux.

Les souches de la collection sont caractérisées d'un point de vue taxonomique (phénotypage et génotypage) et virulence (pathologie expérimentale). Les souches types ainsi que les pathogènes potentiels d'espèces marines sont dupliquées et stockées sur deux sites : Le LGP de la Tremblade et le CNRS-LEMAR de Brest.

L'ensemble des souches de la collection seront référencées et présentées sous forme d'un catalogue, accessible à l'ensemble de la communauté scientifique internationale via le site internet Ifremer/laboratoire communautaire de référence en pathologie des mollusques (fin 2004).

Le laboratoire LGP de La Tremblade coordonne:

- *la caractérisation des souches* : une démarche commune entre les différentes équipes est nécessaire au contrôle qualité, mêmes tests phénotypiques, séquençage des gènes 16S et *gyrB*, validation des nouveaux taxons par hybridation ADN/ADN.
- *l'entretien et la traçabilité de la collection* : un technicien statutaire du laboratoire LGP (Nicole Faury) est en charge des aspects logistiques de la collection c'est à dire : i) centralisation des informations relatives à chaque souche recueillies sur un cahier des charges, ii) procédures d'identification, iii) rédaction de fiches d'identification phénotypique et génotypique (datant de moins d'une année, le jour de l'envoi de la souche). Un repiquage et une confirmation taxonomique des souches (PCR-RFLP *gyrB* et API 20E) sera effectué tout les 5 ans à la Tremblade, les souches seront alors dupliquées et réexpédiées à Brest.
- *Expéditions aux utilisateurs* : les souches seront expédiées en deux exemplaires après repiquage sur Marine Agar avec la fiche d'identification. L'envoi des souches tiendra compte du caractère de dangerosité des souches selon les règles en vigueur en la matière.

En tant que chef de projet je me dois d'inciter à la rédaction de publications scientifiques validant les travaux de recherche et de centraliser ces données bibliographiques sur le site Web du catalogue. J'anime le conseil scientifique qui regroupe les responsables impliqués dans chaque laboratoire, afin d'assurer une gestion en bonne adéquation avec l'évolution de cette collection mais aussi de coordonner et de promouvoir les différents projets scientifiques émanant de cette collection.

III.E.5- Etude d'un modèle d'infection expérimental à *Vibrio splendidus*

Les souches 31 et 32, isolées d'un épisode de mortalité estivale en 2001 ont été retenues comme modèle d'étude de vibriose chez *C. gigas*. Ces souches appartiennent au groupe polyphylétique des *Vibrio splendidus* et montrent un taux d'hybridation ADN-ADN >80% entre elles. Elles entraînent plus de mortalité d'huîtres creuses quand elles sont co-injectées dans le muscle de l'animal. Cet effet agoniste laisse supposer que ces bactéries, proches d'un point de vue génomique, possèdent chacune un trait de virulence spécifique.

La suite de ce travail consiste à caractériser les mécanisme de virulence communs et spécifiques aux deux souches par une approche phénotypique (histo-pathologie, cytométrie, analyse de la toxicité de produit extracellulaire) ou génomique (séquençage complet d'un génome, soustraction génomique).

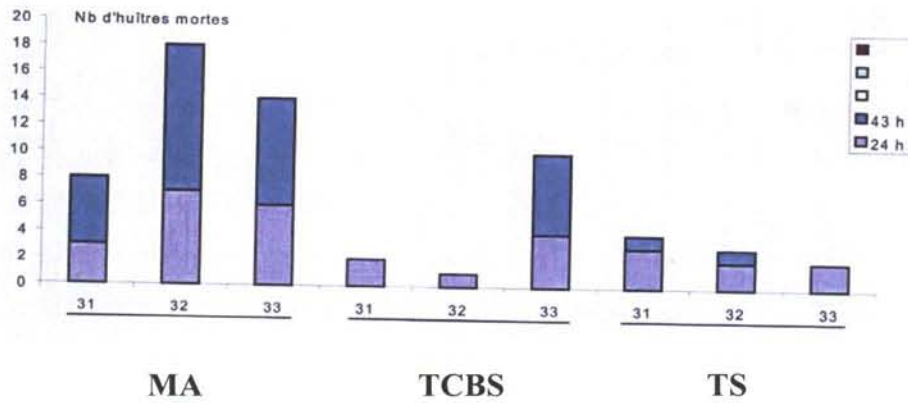


Figure 18: Mortalités cumulées d’huitres creuses obtenues après injection d’ECP des souches 31, 32, 31+32 (33), 24 et 48 heures après culture sur Marine Agar (MA), TCBS, et Tryptic Soy (TS).

III.E.5.a- Description des lésions tissulaires et des altérations cellulaires

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre du doctorat de M. Gay et ont fait l'objet d'une publication (Gay et al., 2004b)

Des études en histologie ont montré que dans les deux cas d'injection (intramusculaire ou intrapalléale) les bactéries 31 et/ou 32 entraînent de fortes altérations des fibres musculaires et qu'elles sont localisées principalement au pourtour du muscle au niveau du tissu conjonctif. Ce résultat a été confirmé en microscopie électronique.

L'analyse en cytométrie en flux de certains paramètres hémostatiques (numération, mortalité, capacité phagocytaire, oxydative burst) suite à des infections expérimentales n'a révélé aucune altération de ces cellules et de leur activité, quelle que soit la bactérie étudiée. Par contre une étude en cyto centrifugation a révélé que les bactéries 31 et/ou 32 sont moins bien phagocytées qu'une souche peu virulente (125, *V. mediterranei*).

Ainsi aucune lésion tissulaire ou altération cellulaire spécifique soit de la souche 31 soit de la souche 32 n'a été mise en évidence pour le moment.

III.E.5.b- Recherche d'exotoxines

Les produits extracellulaires (ECP) des souches 31 et/ou 32 cultivées sur différents milieux (marine agar, Tryptic Soy, TCBS) ont été injectés dans le muscle d'huître creuse (Figure 18). Les ECP de la souche 32 cultivée en milieu marine agar apparaissent plus toxiques que ceux de la souche 31 (taux de mortalité à 48h de 90% contre 40%). Le milieu de culture conditionne l'expression de ce (ces) composé(s) toxique(s). L'étude du profil protéique des ECP en SDS PAGE révèle la présence d'une protéine majoritaire de taille approximative 40 kDa quelque soit le milieu de culture et la bactérie. La recherche de protéase en zymographie révèle la présence de deux bandes quelle que soit la bactérie. Le milieu Marine Agar favorise l'expression de cette activité protéasique.

Dans certaines conditions de culture, la souche 32 exprime une activité exotoxique plus importante que 31 pour une même quantité de protéase détectée.

III.E.5.c- Le séquençage complet du génome de la souche 32

En collaboration avec Didier Mazel, nous avons obtenu le financement de ce projet par la génopole de l'Institut Pasteur. Ce travail est effectué dans le cadre du stage post-doctoral de Mohamed Zouine, financé par l'Ifremer.

Depuis quelques années, l'approche globale du séquençage du génome d'organismes divers s'est révélée comme la méthode la plus productive par l'ampleur des informations qu'elle fournit. Les génomes bactériens sont petits par rapport aux génomes eucaryotes (de l'ordre de 5 mégabases pour les vibrios) et peuvent donc être séquencés plus rapidement. Le séquençage complet du génome de la souche 32 est en cours à l'Institut Pasteur. Pour cela ont été construits : une banque d'ADN génomique petits inserts (1-2 kpb) obtenus par nébulisation de l'ADN génomique, clonés dans le vecteur pCDNA1 ; une banque d'ADN génomique grands inserts (50-100 kb) obtenus par digestion partielle par une enzyme de restriction (ex *HindIII*), clonés dans le vecteur pBeloBAC11.

La phase de séquençage en shotgun est terminée et 50 000 séquences (couverture 5X) sont disponibles. L'annotation du génome devrait être terminée fin 2004.

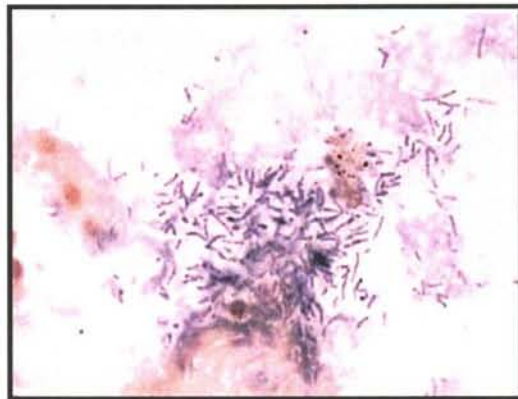


Figure 19: Détection de la souche 32 dans la gonade d'huître par hybridation *in situ* à l'aide de la sonde 2-59,

Chromobactérium violaceum

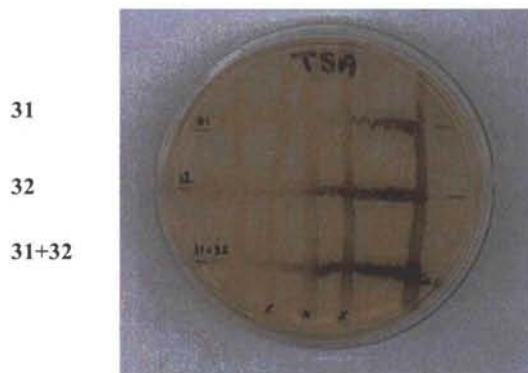


Figure 20: Mise en évidence par co-culture avec un biosenseur d'une production de phéromone (AHL à courte chaîne) par les souches 31 et 32.

III.E.5.d- Soustraction génomique

Ces travaux sont menés par Denis Saulnier, cadre de recherche Ifremer au laboratoire L.G.P de la Tremblade

En parallèle, les bases moléculaires de la spécificité des souches 31 ou 32 sont abordées par une approche de génomique soustractive (banques SSH).

Au sein du génome d'un isolat bactérien on peut distinguer une partie conservée (core genome) qui correspond à l'ensemble des fonctions partagées entre tous les isolats de cette espèce et une partie variable qui correspondrait à la spécificité d'adaptation phénotypique de chaque isolat (22% chez *Helicobacter pylori* ; 20% chez *E. coli*). Les transferts horizontaux par différents mécanismes sont responsables de la diversité de la partie variable du génome. Ces transferts peuvent intervenir entre isolats d'une même espèce ou du même genre, mais aussi avec une efficacité plus faible entre isolats d'espèces plus distantes d'un point de vue phylogénétique. La génomique soustractive nous permet donc d'identifier les parties variables des génomes des souches 31 et 32.

Deux banques soustractives (SSH) ont été construites (31-32 et son opposé 32-31) et la spécificité des clones résultants a été confirmée par une technique d'hybridation en dot blot. Il en ressort que 40% des 171 clones analysés (58 clones) sont spécifiques de l'une ou l'autre des souches. Le séquençage de ces clones montre qu'ils présentent des similitudes avec des gènes impliqués dans le transfert d'ADN exogène, le métabolisme, la virulence ou codant pour des protéines membranaires. En particulier, un gène proche de RTX a été détecté uniquement chez la souche 32.

Les fragments différentiels spécifiques de 31 ou 32 (24 des 58 clones spécifiques) ont été utilisés comme sondes en dot blot avec des membranes où ont été déposés l'ADN des 125 souches de la collection 2001, et ce, afin de sélectionner les sondes les plus spécifiques. Quatre sondes ainsi sélectionnées ont permis la détection des souches 31 ou 32 en hybridation *in situ* (Figure 19).

III.E.5.e- Sécrétion d'homosérine lactone

Des résultats convergents nous permettent de supposer un effet de type quorum sensing dans la virulence et /ou collaboration des souches 31 et 32. Ces deux souches secrètent un même type d'homosérine lactone (Figure 20). Une forte densité cellulaire est nécessaire à la virulence puisque la quantité seuil de 31+ 32 à injecter par huître est de 10^7 CFU en dessous de laquelle les taux de mortalité sont presque nuls. La souche 31, cultivée en milieu conditionné par 32 présente une virulence plus importante qu'en milieu non conditionné.

III.E.6- Utilisation du modèle *V. splendidus* dans le cadre d'une approche intégrative

*L'ensemble de ce travail a été effectué dans le cadre du projet Morest, fédérant plusieurs laboratoires et stations marines (IFREMER, CNRS, Universités) autour d'une approche multidisciplinaire de la problématique des mortalités estivales de l'huître creuse *C. gigas**

La maladie résulte d'un déséquilibre entre capacité immunitaire de l'hôte et virulence du pathogène. Considérant les paramètres liés à l'agent infectieux comme fixes (mêmes conditions de culture et d'entretien, même mode d'infection), le modèle que nous avons développé peut désormais être utilisé pour mieux comprendre la physiologie de l'huître face à une agression microbienne.

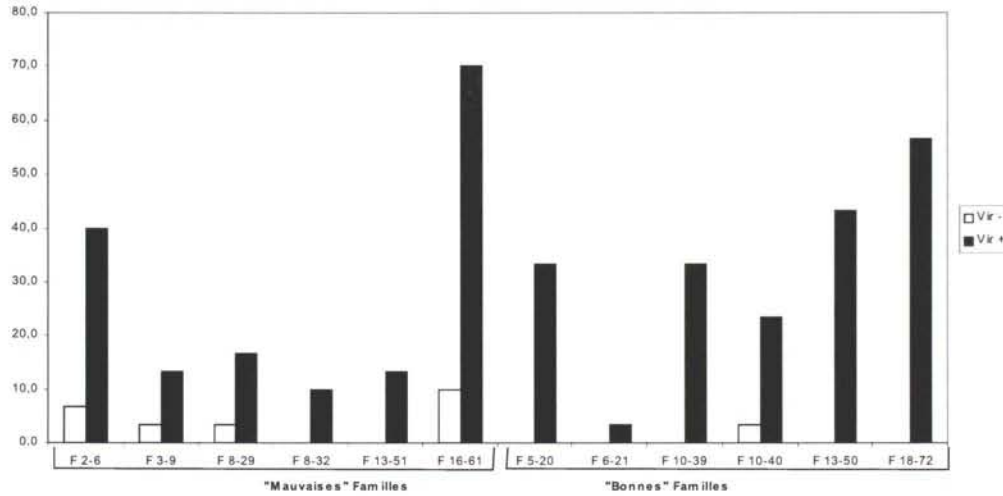


Figure 21: Mortalités cumulées (%) trois jours après injection de bactéries virulentes (30+31+32+33) ou non (45+46+47+48) à des animaux issus de familles donnant de bonnes ou mauvaises performances sur le terrain.

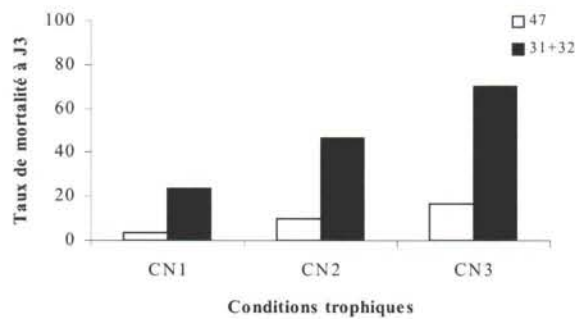


Figure 22: Mortalités cumulées (%) trois jours après injection de bactéries virulentes (31+32) ou non (47) à des animaux ayant reçu un régime alimentaire faible (CN1), moyen (CN2) ou abondant (CN3).

III.E.6.a- Facteurs génétiques

Ces travaux ont été effectués en collaboration avec l'équipe de Pierre Boudry au laboratoire de génétique et pathologie (LGP-Ifremer, La Tremblade).

Dans le cadre du projet Morest, des croisements ont été effectués pour obtenir des familles biparentales qui ont été mises sur sites en 2001 pour observer l'influence du paramètre « famille » sur les mortalités estivales. Suite à d'importantes différences de taux de mortalités obtenues sur 3 sites, certaines familles ont été considérées comme résistantes et d'autres sensibles. Six familles réputées sensibles et six réputées résistantes ont été testées en pathologie expérimentale. Une forte sensibilité aux vibrions est observée chez certaines familles sensibles mais aussi de façon surprenante chez des familles tenues pour résistantes (Figure 21). Des descendants de certaines familles résistantes ou sensibles ont été générés et ont permis de démontrer l'héritabilité du caractère « résistance au syndrome des mortalités estivales ». Des expériences de pathologie expérimentale ont été conduites à nouveau sur des huîtres de seconde génération. Une fois encore, les résultats obtenus ne sont pas corrélés aux résultats obtenus en milieu naturel.

Ces résultats laissent supposer que le caractère sélectionné dans le cadre du projet Morest n'est pas la résistance au vibron. Il n'est pas surprenant que l'observation des mortalités estivales en milieu naturel ne soit pas un critère précis d'identification d'animaux sensibles ou résistants aux vibrions. Les mortalités estivales apparaissent d'étiologie variable, ce qui avait déjà été soupçonné lors de la détection de virus OHV dans des épisodes de mortalité précédents. Par contre la mise en évidence en pathologie expérimentale de familles moins sensibles aux vibrions laisse supposer que le caractère « résistance aux vibrions » est sélectionnable.

III.E.6.b- Facteurs trophiques

Ces travaux ont été effectués en collaboration avec Stéphane Pourreau au laboratoire de physiologie des invertébrés (LPI-Ifremer, Brest).

Des expérimentations effectuées en 2002 et 2003 ont consisté à analyser, sur un cycle semi-annuel, l'effet du niveau trophique sur l'état reproducteur, physiologique, immunitaire et microbiologique de populations d'huîtres juvéniles. L'analyse des résultats n'est, pour l'instant, que partielle mais il en ressort d'ores et déjà qu'un milieu nutritif riche au printemps favorise l'hypertrophie des gonades en été chez *C. gigas* tout en réduisant l'efficacité de ponte, ce qui se traduit par un prolongement de la période de gamétogenèse active. Cette période se caractérise aussi par une efficacité d'assimilation diminuée et un métabolisme accru. Ce bilan est d'autant plus négatif que le développement des gonades est élevé.

Si à ce déficit énergétique s'ajoute un « stress supplémentaire » (stress thermique, trophique, hypoxique ou infectieux), la probabilité d'apparition de mortalité augmente.

Ainsi des lots d'huîtres ayant eu un régime alimentaire quantitativement différent (CN1 : peu ; CN2 : moyen ; CN3 : fort) ont été testés en pathologie expérimentale et ont montré une sensibilité des huîtres aux vibrions corrélée au régime alimentaire (Figure 22).

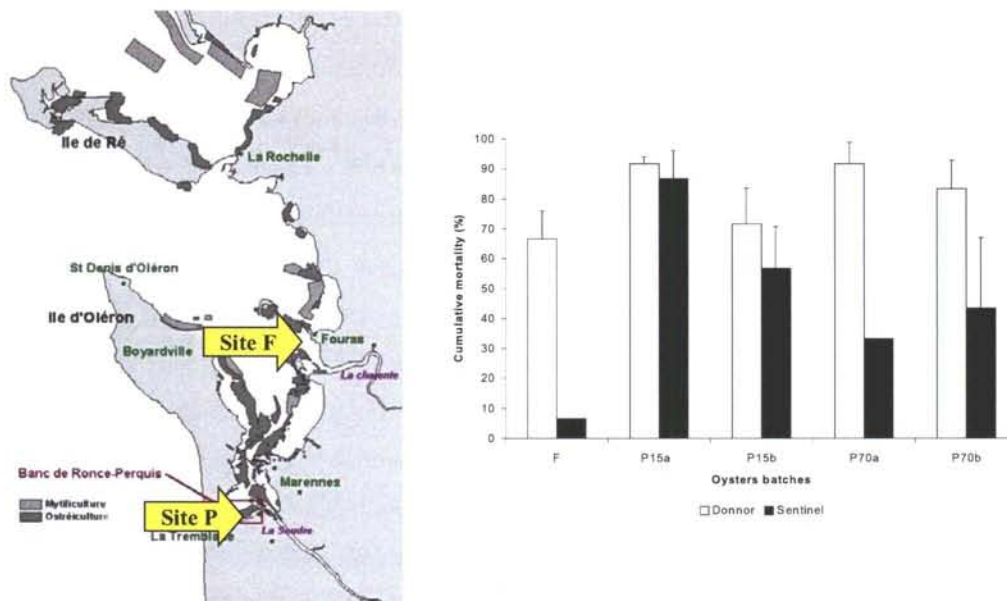


Figure 23: Mortalités cumulées (%) d'animaux receveurs (non injectés), 5 jours après cohabitation avec des animaux donneurs (injectés par 31+32)

III.E.6.c- Facteurs environnementaux

Ces travaux ont été effectués en collaboration avec l'équipe d'O. Lemoine, au laboratoire conchylicole de Poitou Charente (LCPC-Ifremer, La Tremblade).

Différents essais visant à infecter les huîtres par voies naturelles ont échoué. Il s'agissait d'incuber des huîtres avec un mélange de vibron préalablement cultivé en bouillon. Cependant il est aujourd'hui clairement établi que la croissance des bactéries en milieu nutritif artificiel peut jouer un rôle sur le déterminisme de la virulence (Mekalanos et al., 1992). Parce que l'interaction hôte/pathogène peut être indispensable à l'expression de la virulence, nous avons ensuite réalisé des expériences de cohabitation d'huîtres préalablement injectées par le mélange des bactéries 31 et 32 avec des animaux non injectés. Ces expériences ont aussi échouées. La nécessité d'un état physiologique de l'huître et/ou d'un stress environnemental pour la transmission de vibrions pathogènes ou pour le développement de la maladie a alors été envisagé.

En étudiant la répartition des mortalités estivales d'huîtres creuses dans le bassin de Marennes d'Oléron, l'équipe du LCPC a observé que les taux de mortalité d'huîtres élevées près du sol sont plus importants que ceux des huîtres élevées sur table (Soletchnik et al., 1999). Ces résultats suggèrent un effet du sédiment dans ce syndrome, bien que le mécanisme et la cible d'action (hôte ou pathogène) reste inconnue.

Nous avons donc étudié l'effet « proximité du sédiment » sur la transmission ou l'évolution de la vibriose en laboratoire. Pour cela des huîtres ont été élevées pendant 4 mois sur table à 15 ou 70 cm du sédiment au site P ou à 70cm du sédiment au site F (Figure 23). Le jour du prélèvement elles ont été soit traitées immédiatement en infection expérimentale (P15, 70a), soit lavées et maintenues 24 heures en stabulation (P15, 70b). Après injection du mélange 31 + 32 en intra musculaire, les animaux dits « donneurs » ont été placés en cohabitation avec des huîtres des mêmes lots mais non injectées (dites « receveurs »).

Chez les receveurs du site P, le taux de mortalité est plus important chez les animaux élevés à 15cm que 70cm. Cette différence est moins nette quand les huîtres sont mises en stabulation avant injection. Aucune mortalité n'est observée chez des receveurs du site F, même en présence de sédiment prélevé au site P. Ces résultats suggèrent un rôle nécessaire mais non suffisant du sédiment dans l'apparition de mortalité chez les receveurs.

L'expérience a été renouvelée à intervalle régulier de 15 jours de mi-mai à mi août, la transmissibilité est nulle en mai, forte en juin et juillet (maturation), moindre en août (post-ponte). Ces résultats suggèrent un effet de la maturation dans l'apparition de mortalité chez les receveurs. Enfin, nous confirmons une graduation de la virulence entre les souches 125, 31 et 32 chez les donneurs et receveurs.

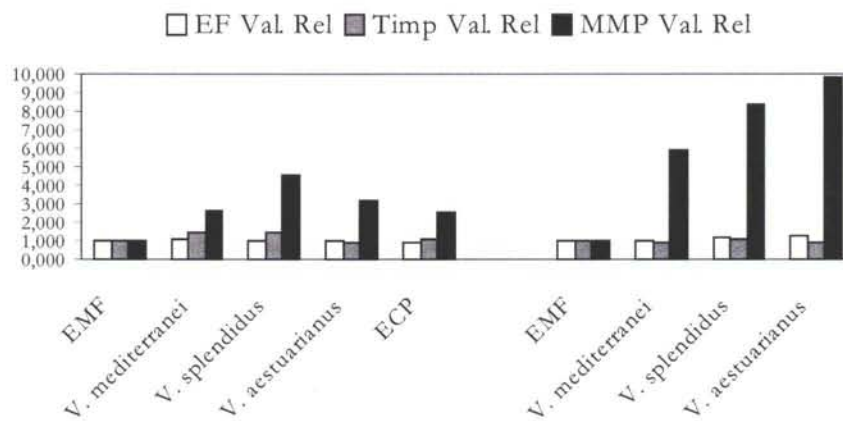


Figure 24 : Analyse de l'expression de trois gènes: EF, elongation factor; Cg TIMP et MMP (métalloprotéase) 12 et 24 heures après injection d'huîtres par différentes souches de *Vibrio*, d'une préparation d'ECP de *V. aestuarianus* ou d'eau de mer filtrée. Résumé des résultats obtenus par Northern blot quantifié au phosphoimager.

III.E.6.d- Recherche de marqueurs immunitaires

Ces travaux ont été effectués en collaboration avec Jean Michel Escoubas (Chercheur CNRS) et seront poursuivis par Viviane Boulo (Cadre de recherche Ifremer) au laboratoire d'immunologie des invertébrés (Ifremer, Montpellier).

Les huîtres, comme tous les invertébrés, sont dépourvus d'immunité adaptative. Leur système de défense repose sur un système immunitaire inné avec une composante cellulaire (chimiotactisme, opsonisation, phagocytose, destruction lysosomiale) et une composante humorale (lysozymes, agglutinines, inhibiteurs de protéases) faisant intervenir les hémocytes. L'étude des bases moléculaires de la réponse immunitaire chez l'huître par une approche globale (mRNA display, EST) fait l'objet du projet de recherche de cette équipe depuis plusieurs années (J. M. Escoubas, 2004).

La technique « mRNA differential display » lui a permis d'isoler entre autre un ADNc, appelé Cg-Timp, fortement similaire aux inhibiteurs de métalloprotéinases de vertébrés (Montagnani et al., 2002). Chez les vertébrés, les TIMPs (Tissus Inhibitors of Metalloproteinases) sont des éléments essentiels du contrôle de l'activité des métalloprotéinases de la matrice (MMP) et sont de ce fait directement impliqués dans tous les processus biologiques faisant intervenir le remodelage de la matrice extracellulaire tels que le développement embryonnaire, l'angiogenèse ou la réparation de lésions. Certains auteurs rapportent aussi l'implication des TIMPs et des MMPs dans la réponse inflammatoire et dans l'immunité innée.

Cg-timp est le deuxième inhibiteur de protéase de cette famille caractérisé chez un invertébré et le premier chez un mollusque. L'analyse de l'expression de *Cg-timp* en Northern blot et hybridation *in situ* a montré que ce gène est exprimé spécifiquement par certains hémocytes. Son expression est induite après cassure de la coquille suggérant son implication dans la réparation des lésions. Chez des animaux injectés par un mélange de vibrions (*V. anguillarum*, *V. metschnikovii*, *V. tubiashii* et *Vibrio* sp S322) une augmentation dose-dépendante du taux de transcrits de *Cg-timp* dans les hémocytes nous laisse supposer l'implication de *Cg-Timp* dans les mécanismes de défense de *C. gigas*. La caractérisation de cet inhibiteur de métalloprotéase rappelle les données bibliographiques définissant les métalloprotéases comme facteurs de virulence de vibron (Milton et al., 1992).

L'approche de mRNA differential display a été mise en œuvre sur des populations d'hémocytes, issus soit d'huîtres naïves, soit d'huîtres stimulées par injection d'un mélange bactérien (*E. coli*, *M. luteus* et *V. anguillarum*). D'autres gènes potentiellement impliqués dans la réponse immunitaire ont été caractérisés par une approche EST (<http://www.ifremer.fr/GigasBase>) basée sur une banque d'ADNc réalisée à partir d'ARNm extraits d'hémocytes prélevés sur des huîtres stimulées par l'injection d'un mélange de bactéries tuées (*E. coli*, *M. luteus* et *V. alginolyticus*). Ces deux approches ont donc été réalisées avec des bactéries qui n'ont pas été isolées de *C. gigas*.

Nous avons mesuré l'expression de certains gènes dans des hémocytes prélevés d'animaux injectés par des vibrions isolés de *C. gigas* (Figure 24). Il s'agissait de la souche 125 (*V. mediterranaei*, peu virulent) et 32 (*V. splendidus*, virulent) mais aussi de la souche isolée au LPI 01/32 (*V. aestuarianus*, virulent). Trois jours après injection, ces vibrions ont entraîné réciproquement 20, 60 et 60% de mortalité. Alors que l'expression d'un gène présentant des similitudes de séquence pour une métalloprotéase (MMP) est activée par l'injection de vibrions quelque soit la souche utilisée, nous n'avons pas observé d'augmentation des transcrits de *Cg*

TIMP. L'expression d'autres gènes, n'a pas pu être détectée. Ces résultats préliminaires sont inattendus et doivent être confirmés. L'ensemble de ce travail souligne d'ores et déjà l'intérêt d'avoir développé un modèle d'interaction *C. gigas*-vibron, basé sur des souches infectant naturellement cet animal.

III.E.6.e- Développement d'un modèle d'infection à *Vibrio aestuarianus*

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre du stage de licence professionnelle d'Eric Lazaille.

Dans le cadre du projet Morest, l'équipe de Jean Louis Nicolas au LPI de Brest a recherché la présence de bactéries septicémiques chez des huîtres subissant des épisodes de mortalité. Différentes souches de vibrions ont ainsi été isolées, certaines appartiennent au groupe polyphylétique des *V. splendidus*, d'autres à l'espèce *V. aestuarianus*. Dans les deux cas il existe des souches virulentes (01/32) ou non (01/64) (Yannick Labreuche, pers.com).

Parmi les 125 isolats de notre collection une dizaine de souches ont été apparentées à l'espèce *V. aestuarianus* sur la base de la phylogénie *gyrB* mais n'ont pas été sélectionnées comme virulentes dans le modèle palourde (Gay et al., 2004a). Or les souches 38, 39, 40 induisent réciproquement 70, 45, 60% de mortalité 3 jours après injection d'huître. Un effet additif est obtenu en co-injectant les souches 39+40 puisqu'on obtient alors 90% de mortalités.

Ainsi l'effet agoniste entre souches de vibron n'est pas observé uniquement chez des isolats apparentés à *V. splendidus* mais aussi chez des bactéries appartenant à une autre espèce : *V. aestuarianus*.

Article 12 : Waechter & al. 2002

Caractérisation de bactéries pathogènes de naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas*

Magali Waechter^a, Frédérique Le Roux^{b*}, Jean-Louis Nicolas^c, Éric Marissal^a, Franck Berthe^b

^a *Écloserie Grainocéan, 14, cours Dechézeaux, 17410 Saint-Martin-de-Ré, France*

^b *Laboratoire de génétique et pathologie, Ifremer, 17390 La Tremblade, France*

^c *Laboratoire de physiologie des invertébrés, Ifremer, 29280 Brest, France*

Reçu le 5 octobre 2001 ; accepté le 21 janvier 2002

Présenté par Claude Combes

Abstract – Characterisation of *Crassostrea gigas* spat pathogenic bacteria. The French mollusc production is mainly based on the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*. Since 1991, outbreaks of mass mortality of juveniles are reported during the summer period. These outbreaks are a major concern of oyster industry. Several studies have established given bacterial strains to be pathogenic for bivalve species, including oysters. Here we present a study of mortality outbreaks of *C. gigas*, as initiated in 1995. In a first step, bacterial strains were isolated during mass mortality outbreak and were biochemically characterised. Among the isolated strains, some strains of *Vibrio splendidus* biovar II were found to be pathogenic by means of experimental challenge of oyster juveniles. In the second step, a genotypical identification of the pathogenic strain was undertaken, based on 16S RNA sequences and phylogenetic analysis. It confirmed that the pathogenetic strain belonged to *Vibrio splendidus* biovar II. **To cite this article:** M. Waechter et al., C. R. Biologies 325 (2002) 231–238. © 2002 Académie des sciences / Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

summer mortality / *Vibrio splendidus* II / experimental challenge / virulence

Résumé – La production d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, est aujourd'hui la principale production française de coquillages. Depuis 1991, de forts taux de mortalité de naissain sont rapportés en période estivale. Ces épisodes récurrents sont apparus comme un sujet préoccupant pour l'ensemble de la profession ostréicole. De nombreuses études ont établi le caractère pathogène de certaines souches de bactéries pour diverses espèces de bivalves, dont l'huître creuse. Cependant, la plupart de ces souches sont isolées au cours de la phase larvaire. Après la métamorphose, les bivalves semblent devenir plus résistants aux agressions bactériennes. Une étude de bactéries associées à des épisodes de mortalité de *C. gigas* a été initiée dès 1995 au laboratoire Ifremer de La Tremblade. Dans une première phase, des souches bactériennes isolées lors d'épisodes de mortalité ont été caractérisées biochimiquement. Parmi ces bactéries, des souches de *Vibrio splendidus* biovar II se sont révélées pathogènes du naissain en conditions expérimentales. Dans une seconde phase, l'identification génotypique d'une souche reconnue pathogène a été entreprise par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S et par une étude phylogénétique. Elle confirme l'appartenance de la souche à *Vibrio splendidus* biovar II. **Pour citer cet article :** M. Waechter et al., C. R. Biologies 325 (2002) 231–238. © 2002 Académie des sciences / Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

mortalité estivale / *Vibrio splendidus* II / pathologie expérimentale / virulence

*Correspondance et tirés à part.

Adresse e-mail : fleroux@ifremer.fr (F. Le Roux).

. Abridged version

1. Introduction

Today, the French shellfish production is mainly based on the Pacific cupped oysters, *Crassostrea gigas*. The spat used in oyster farms comes either from natural harnessing, or from hatcheries (nowadays between 10 and 15% of the total spat).

Since 1991, during the summertime, as the temperature increases, high *C. gigas* spat mortality rates (60 to 100%) occur in the field and also in some hatcheries. For ten years, oyster farmers have been very concerned by these outbreaks.

As these mortalities have been studied, a herpesvirus-like agent has been identified in cupped oysters larvae and spat as well as in other mollusc species. The pathogenicity of this agent has been demonstrated on larvae, but its effects on the spat are still being experimented. Furthermore, some strains of bacteria have been recognised as pathogenic for several bivalve species including the Pacific cupped oyster.

In the present study, some bacterial strains have been isolated from a mortality outbreak of *C. gigas* spat on a rearing site. These strains have been first phenotypically characterised. Among them, some pathogenic bacteria from the genus *Vibrio* have been identified by infection trials on *C. gigas* spat. The RNA 16S-coding gene has been sequenced so that molecular identification of the pathogenic strain could be achieved.

2. Experimental approach

During the summer 1997, pathogenic bacteria have been sought from natural harnessing spat during a mortality outbreak (mortality rate at sampling time: 60%).

Bacterial strains have been obtained from ground flesh of spat diluted in sterile sea water and spread out over two media: Zobell medium, on which grows the whole heterotrophic flora and TCBS, specific for the *Vibrionaceae* flora. The identification of the isolated strains has been realised with the results of 35 biochemical tests.

For each strain, fifty animals from 5 mm to 1 cm have been inoculated by bath in a bacterial suspension of about 10^7 bacteria ml^{-1} during 48 h at 20 °C. Animals have been rinsed and maintained in 20 l for two months at 20 °C with phytoplankton (*Chaetoceros calcitrans*) daily. Afterwards, some batches have been transferred to a 3-l aquarium. The spat has been regularly observed and considered as dead when the valves do not shut anymore and the mantle do not react after stimulation by prick. The dead animals have been sampled to seek for the inoculated bacterial strain and verify the Koch's postulate.

Several batches of spat non-inoculated were used as negative control and two positive controls have been used: strains CRL10 and CRL22 of *Vibrio tubiashi*, pathogenic for molluscs' larvae and spat.

After phenol/chloroform extraction, the bacterial 16S gene has been amplified by PCR with universal primers (5'-CTCAGATTCAACGCTGGCGG-3' and 5'-GGCGGTGTGTACAAGGCCCG-3'). PCR product has been cloned and sequenced. The sequence obtained has been aligned with 32 other *Vibrionaceae* 16S sequences (Table 1) and phylogenetic analysis has been conducted using three methods: neighbour-joining, maximum likelihood and maximum parsimony.

3. Results

During the mortality outbreak of September 1997, some characteristic signs were observed on the sampled dying animals: strong smell, weakness of the adductor muscle, which leads to a failure in the shutting of the valves. Samples were examined by PCR for the herpesvirus but the results were negative.

Three main bacterial genera have been isolated from the dying spat: (1) strains related to the *Cytophaga/Flavobacterium* group, (2) Strains related to *Agrobacterium*, (3) strains belonging to *Vibrio*. MNEMF5 strain related to *Cytophaga/Flavobacterium* is the major strain on Zobell medium with 10^5 bacteria per gram of spat flesh.

The different isolated strains have been tested in infection trials with *C. gigas* spat. Six negative controls showed a low cumulative mortality rate (between 0 and 12%) at the end of the experiment. The two *Vibrio tubiashi* strains, CRL10 and CRL22, provoked cumulative mortality rates of 80% and 10% after two months. Two strains of *Vibrio splendidus* biovar II, MNEF2 and TNEMF6, caused a mortality of 10 and 18%, whereas TNEMF8 strain does not seem to have affected the animals. Finally, MNEF5 strain (*Cytophaga*) does not raise the cumulative mortality rate.

Some batches were then maintained in a 3-l aquarium for one more month. The *V. splendidus* strains MNEF2 and TNEMF6 caused a cumulative mortality of respectively 12 and 80%, showing a different pathogenicity, although they both belong to the same species. The positive control showed a mortality of 76%, whereas 6% of the non-inoculated spat died.

The animals that died during the experiment have been analysed to quantify the bacterial strains in the tissues: the animals infected with TNEMF6 showed 5×10^5 bacteria per gram of flesh and this strain was the major one.

In the second set of experiments, the pathogenic feature of TNEMF6 strain has been confirmed with

mortalities of 32 and 26% after seven weeks, whereas the controls showed 12% for CRL 10 and 2% for CRL 22.

The molecular characterisation (16S gene sequencing and alignment with 32 other *Vibrio* strains) led to a phylogenetic study of this strain. Its result confirms the phenotypic identification by relating this strain to *Vibrio splendidus* biovar II.

4. Discussion

The frequently occurring outbreaks of summer mortality concerning the oyster spat are of great concern for the oysters' farmers who fear the disappearance of *C. gigas* due an epizooty as the Portuguese oyster *C. angulata*. Since 1995, our laboratory described bacterial strains associated with mortality outbreaks. In this study, we present the isolation of the first bacterial strain potentially pathogenic for the cupped oyster's spat in France. This strain (TNEMF6) has been isolated from natural harnessing spat sampled during a mortality outbreak. It has been phenotypically and genotypically identified as *Vibrio splendidus* biovar II. Other *V. splendidus* isolated strains have a low virulence (as MNEF2) or none (as TNEMF8). *V. splendidus* is widely spread in marine ecosystems. Few strains are virulent in this ubiquitous species. Furthermore, the classification within one species of all these strains should be re-examined with the actual knowledge of molecular phylogeny, which suggests the existence of distinct groups. The confirmation of the existence of several species could only be obtained by DNA-DNA hybridisations with strains representative of the different groups.

V. splendidus strains have been associated with mortalities of *C. gigas* larvae, of scallops *Pecten maximus* and of fish. A great diversity of virulence between strains of the same species has been observed

with the different animal models. Up to now, the only way to determine the virulence of a strain is to realise experimental exposures. This approach is inconvenient and results may vary from one trial to another. We do not have any phenotypic or genotypic feature to distinguish a pathogenic *V. splendidus* strain. Studies on restriction profiles of ribosomal genes or RAPD did not lead to the identification of a pathogenicity marker. We are now working on the development of diagnostic tools specific of virulence factors. The steps will be: (1) establishment of a collection of *V. splendidus* strains, (2) genomic subtraction between virulent and non-virulent strains, (3) cloning of virulence genes. At the same time, in vitro models will be developed to test the virulence of the bacteria.

An interesting point of this work is the virulence variability of the pathogenic strains, depending on the experimental conditions. For example, the spat infected with *V. tubiashi* (CRL 10) shows a mortality rate of 80% in the 20-l tank and a mortality rate of only 12% in the second experiment. During the first set of experiments, the mortality rates of the spat infected with *V. tubiashi* (CRL 22) and *V. splendidus* (TNEMF6) were about 10% after two months in 20-l tanks, but after one more month in aquarium, the mortality rate reached 80%. On the other hand, although the batch infected with MNEF2 strain received the same experimental changes, the pathogenicity of this strain was not modified. Thus, the spat origin, the rearing methods and the *Vibrio* strain seem to be important factors.

These results are in agreement with the summer mortality field studies indicating a complex aetiology with several factors implicated (environmental conditions, physiological, genetic and pathological parameters). We propose to realise infection trials on the virulence of the isolated strains under variable environmental conditions and with distinct genetic families.

1. Introduction

La production d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, est aujourd'hui la principale production française de coquillages. Le naissain mis en élevage dans les différents centres de production est obtenu par captage naturel ou par élevage en éclosérie (actuellement de 10 à 15% du naissain mis en élevage)

En période estivale, à la faveur de températures élevées, de forts taux de mortalité de naissain d'huître creuse, *C. gigas*, (de 60 à 100%) sont rapportés régulièrement depuis 1991, en milieu naturel et, quelquefois, dans certaines écloséries nurseries. Au cours

des dix dernières années, ces épisodes récurrents sont apparus comme un sujet préoccupant pour l'ensemble de la profession ostréicole [1].

Les études menées dans le but d'identifier les causes de ces épisodes de mortalité ont révélé l'existence d'un agent viral de type herpès chez les larves et le naissain d'huître creuse, ainsi que chez d'autres espèces de mollusques [2, 3]. Si la pathogénicité de ce virus a pu être démontrée pour les stades larvaires [4], la reproduction expérimentale de la maladie sur naissain fait encore l'objet d'études. Par ailleurs, de nombreuses études ont établi le caractère pathogène de certaines

souches de bactéries pour diverses espèces de bivalves, dont l'huître creuse [5–11].

Dans ce travail, des souches bactériennes ont été isolées lors d'un épisode de mortalité de naissain de *C. gigas*, survenu en site d'élevage. Ces souches ont été caractérisées phénotypiquement dans un premier temps. Parmi ces souches, des bactéries pathogènes du genre *Vibrio* ont été sélectionnées par reproduction expérimentale de la maladie sur naissain de *C. gigas*. L'identification moléculaire de la souche reconnue pathogène a été entreprise par séquençage du gène codant pour l'ARN 16S.

2. Matériel et méthodes

2.1. Prélèvement

Au cours de l'été 1997, un épisode de mortalité a été rapporté sur du naissain de captage naturel d'Arcachon placé en Charente Maritime pour prégrossissement sur filières en mer. La recherche de souches pathogènes a été effectuée sur un échantillon de naissain prélevé en septembre 1997, correspondant au taux maximal de mortalité (60%).

2.2. Bactériologie

Les souches bactériennes ont été obtenues à partir de broyats de chair de naissain dilués en eau de mer stérile et étalés sur deux types de milieux : milieu de Zobell, permettant d'isoler la flore hétérotrophe totale, et milieu TCBS, sélectif pour la flore *Vibrionaceae*. La caractérisation des souches isolées, en termes de genre et d'espèce, a été réalisée à partir de 35 tests biochimiques : Gram, mobilité, présence de flagelle, luminescence, oxydase, gélatinase, uréase, MEVAG, V.F., Citrate de Simmons, Kligler–Hajna, acidification de l'arabinose, du mannitol et du saccharose, ADH, LDC, ODC, indole, Voges–Proskauer, nitrate, ONPG, croissances à 0, 6, 8, 10% de NaCl, croissances à 4, 20, 35 et 40 °C, croissance sur α -kétoglutarate, D-glucosamine, L-arabinose, [12]. Les tests nécessitant une croissance, excepté ceux à différentes salinités, ont été adaptés à l'étude de souches marines par addition de 2% de NaCl ou d'eau de mer artificielle dans les milieux et réactifs. Les résultats de ces tests sont utilisés dans des arbres dichotomiques d'identification, construits à partir de données bibliographiques [13, 14].

2.3. Pathologie expérimentale

Pour chaque souche testée, cinquante animaux de 5 mm à 1 cm ont été infectés par immersion dans une suspension bactérienne d'environ 10^7 bactéries ml^{-1} , pendant 48 h à la température de 20 °C.

Dans la première série d'expériences, le naissain inoculé avec chacune des souches isolées a été rincé, puis placé en bac de 20 l pendant deux mois en structure d'élevage. Par la suite certains lots ont été maintenus dans un aquarium contenant 3 l d'eau de mer stérile et équipé d'un système d'oxygénation par bullage. Du phytoplancton (*Chaetoceros calcitrans*) a été distribué quotidiennement. La température a été maintenue à 20 °C pendant l'expérience.

Dans la seconde série d'expériences, le naissain a été inoculé, comme précédemment, avec certaines des souches sélectionnées. Le naissain a été rincé puis maintenu en aquarium contenant 3 l, comme précédemment. Le naissain a été observé régulièrement et a été considéré comme mort lorsqu'il y avait absence de fermeture des valves et de rétraction du manteau après stimulation par piqure. Les animaux morts ont été prélevés afin de rechercher la souche bactérienne inoculée dans les tissus et de vérifier ainsi le postulat de Koch.

Plusieurs lots de naissain non inoculé fournissaient un contrôle, alors que deux contrôles positifs étaient utilisés : les souches de *Vibrio tubiashi* CRL10 et CRL22, pathogènes pour les larves et le naissain de mollusque [15–17].

2.4. Caractérisation moléculaire

L'ADN bactérien a été extrait par la technique classique de lyse en présence de protéinase K, extraction au phénol/chloroforme et précipitation à l'éthanol [18]. Le gène codant pour l'ARN 16S a été amplifié par PCR à l'aide des amorces universelles dont les séquences suivent : 5'-CTCAGATTCAACGCTGGCGG-3' et 5'-GGCGGTGTGTACAAGGCCCG-3'. La réaction d'amplification a été réalisée suivant les conditions standards définies pour la Taq DNA polymérase Silverstar (Eurogentec). Le produit de PCR a été cloné dans le vecteur pCRII (*TA cloning kit*, Invitrogen). Les mini-préparations d'ADN plasmidique obtenues par lyse alcaline [18] ont alors été utilisées pour le séquençage de l'insert (Appligène). La séquence obtenue a été alignée avec 32 autres séquences de *Vibrionaceae* (Tableau 1), tandis qu'une analyse phylogénétique a été réalisée en utilisant trois méthodes : *neighbour-joining*, *maximum likelihood* et *maximum parsimony*.

3. Résultats

Au cours de l'épisode de mortalité du naissain en mer, survenu en septembre 1997, des signes caractéristiques sont apparus sur les animaux moribonds échantillonnés : perception d'une forte odeur, faiblesse du

Tableau 1. Numéros d'accèsion du gène codant pour l'ARN 16S des souches utilisées pour l'analyse phylogénétique.

Souches	Numéro d'accèsion
Souche TNEMF6	
<i>V. splendidus</i> (II)	AB038030
<i>V. splendidus</i> (I)	A33125
<i>V. pelagius</i>	AJ293802
<i>V. campellii</i>	X74692
<i>V. parahaemolyticus</i>	X74720
<i>V. carchariae</i>	X7493
<i>V. proteolyticus</i>	X74723
<i>V. haliotocoli</i>	AB000393
<i>V. natriegens</i>	X74714
<i>V. fluvialis</i>	X74703
<i>V. aestuarianus</i>	AF172840
<i>V. lentus</i>	AJ278881
<i>V. mediterranei</i>	X74710
<i>V. orientalis</i>	X74719
<i>V. vulnificus</i>	X76334
<i>V. ordalii</i>	X74727
<i>V. tapetis</i>	Y08430
<i>V. scophthalmi</i>	U46579
<i>V. pectenicida</i>	Y13830
<i>V. shiloi</i>	AF007115
<i>V. gazogenes</i>	X74705
<i>V. fischeri</i>	X74702
<i>V. anguillarum</i>	X71821
<i>V. salmonicida</i>	X70643
<i>V. ordalii</i>	X74718
<i>V. tubiashi</i>	X74725
<i>V. mytili</i>	X99761
<i>V. diabolicus</i>	X99762
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	X74687
<i>P. angustum</i>	X74685
<i>P. leiognathi</i>	X74686
<i>P. damsela</i>	X74700

muscle adducteur entraînant un défaut de fermeture des valves et présence d'une vase jaune-verdâtre au fond de la valve inférieure des animaux moribonds. Une recherche du virus de type herpès a été effectuée par PCR sur ces prélèvements et s'est révélée négative [19].

Les résultats de la caractérisation phénotypique des souches bactériennes isolées sont résumés dans le [Tableau 2](#). Trois genres bactériens principaux ont été isolés à partir du naissain moribond : (1) souches apparentées au groupe *Cytophaga/Flavobacterium*, (2) souches apparentées aux *Agrobacterium*, (3) souches appartenant aux *Vibrio*. La souche MNEMF5, apparentée aux *Cytophaga/Flavobacterium* est majoritaire sur milieu gélosé de Zobell, avec 10^5 bactéries par gramme de chair de naissain.

Ces différentes souches ont été testées en pathologie expérimentale sur naissain de *C. gigas*. Les six témoins négatifs font apparaître des taux de mortalité cumulée réduits (de 0 à 12%) à l'issue de l'expérience. Les deux souches de *Vibrio tubiashi*, CRL10 et CRL22, induisent respectivement des mortalités cumulées de 80 et 10% au bout de deux mois. Deux souches de *Vibrio splendidus* biovar II, MNEF2 et TNEMF6 entraînent une mortalité de 10 et 18%, alors que la souche TNEMF8 ne semble pas affecter les animaux. Enfin, la souche de *Cytophaga* MNEF5, majoritaire en dénombrement ([Tableau 2](#)) n'augmente pas le taux de mortalité cumulée.

Certains lots ont ensuite été maintenus en élevage pendant un mois supplémentaire en aquarium de 3 l. Les souches de *Vibrio splendidus* MNEF2 et TNEMF6 entraînent une mortalité cumulée respectivement de 12 et 80%, témoignant d'une pathogénicité différente, bien que ces deux souches appartiennent à la même espèce.

Tableau 2. Identification phénotypique de souches bactériennes isolées sur boîte Zobell (MNEMF) et TCBS (TNEMF). Le dénombrement correspond au nombre de bactéries par gramme de chair de naissain broyé ; l'étude bactériologique définit la souche par genre, voire par espèce.

Souche	Dénombrement	Genre	Espèce
MNEMF1	700	<i>Vibrio</i>	<i>anguillarum</i>
MNEMF2	10^4	<i>Vibrio</i>	<i>splendidus</i> II
MNEMF3	10^4	<i>Agrobacterium</i>	sp.
MNEMF4	10^3	<i>Cytophaga</i>	sp.
MNEMF5	10^5	<i>Cytophaga</i>	sp.
MNEMF6	10^3	<i>Cytophaga</i>	sp.
TNEMF1	180	<i>Vibrio</i>	<i>fluvialis</i>
TNEMF2	10^3	<i>Vibrio</i>	<i>mediterranei</i>
TNEMF3	360	<i>Vibrio</i>	<i>pelagius</i> I
TNEMF4	10^3	<i>Vibrio</i>	<i>nigripulchritudo</i>
TNEMF5	720	<i>Vibrio</i>	<i>mediterranei</i>
TNEMF6	130	<i>Vibrio</i>	<i>splendidus</i> II
TNEMF7	180	<i>Agrobacterium</i>	sp.
TNEMF8	540	<i>Vibrio</i>	<i>splendidus</i> II
TNEMF9	100	<i>Vibrio</i>	<i>splendidus</i> II

Tableau 3. Seconde série de pathologie expérimentale. La souche *Vibrio splendidus* TNEMF6 (expérience dupliquée) et les souches contrôle *Vibrio tubiashi* CRL 10 et CRL 22 ont été inoculées par balnéation au naissain de *Crassostrea gigas*. La concentration de l'inoculum est déterminée par dénombrement sur boîte Zobell et donné en bactéries par ml. Après 48 h d'incubation et rinçage, le naissain est élevé en aquarium de 3 litres. Une surveillance régulière des animaux permet de définir le taux de mortalité cumulé au cours de 45 jours et sept semaines.

Souches	Genre, espèce	Concentration	Mortalité à sept semaines
Néant			6%
TNEMF6	<i>Vibrio splendidus</i> II	2,1 10 ⁶	32%
			26%
CRL10	<i>Vibrio tubiashi</i>	7,8 10 ⁵	12%
CRL22	<i>Vibrio tubiashi</i>	8,5 10 ⁵	2%

Le contrôle CRL 22 induit une mortalité de 76%, alors que le naissain non inoculé subit une mortalité de 6%.

Les animaux morts au cours de l'expérience ont été analysés afin de quantifier les souches bactériennes présentes dans les tissus : les naissains inoculés avec la souche TNEMF6 présentent un dénombrement de 5 10⁵ bactéries par gramme de chair ; cette souche apparaît comme majoritaire.

Dans une seconde série d'expériences d'infection expérimentale, le caractère pathogène de la souche TNEMF6 a été confirmé, avec des mortalités de 32 et 26% au bout de sept semaines, alors que les témoins donnent 12% pour CRL 10 et 2% pour CRL 22 (Tableau 3).

Le séquençage du gène codant pour l'ARN 16S de la souche TNEMF6 et l'alignement de cette séquence avec celle de 32 autres souches de *Vibrio* ont permis l'étude phylogénétique de cette souche (Fig. 1). Cette analyse moléculaire affine sans ambiguïté cette souche à *Vibrio splendidus* II, confirmant ainsi la caractérisation phénotypique.

4. Discussion

Les épisodes récurrents de mortalité estivale de naissains d'huître inquiètent les professionnels, qui craignent qu'à l'instar de l'huître portugaise, *C. angulata*, *C. gigas* puisse disparaître à son tour, suite à une épizootie [20]. Depuis 1995, notre laboratoire s'est attaché à décrire des souches bactériennes associées à

Fig. 1. Position taxonomique de la souche TNEMF6 dans le genre *Vibrio*. La topologie de cet arbre non raciné a été obtenue par un algorithme d'analyse de maximum de vraisemblance (*maximum likelihood*). Les branches retrouvées par la méthode de parcimonie maximum sont notées par un double astérisque. Les valeurs supérieures à 50% marquent les branches obtenues par un algorithme d'analyse de matrice de distance (*neighbour joining*) et indiquent comment ces branches sont validées par l'analyse de réplication (analyse de *bootstrap*).

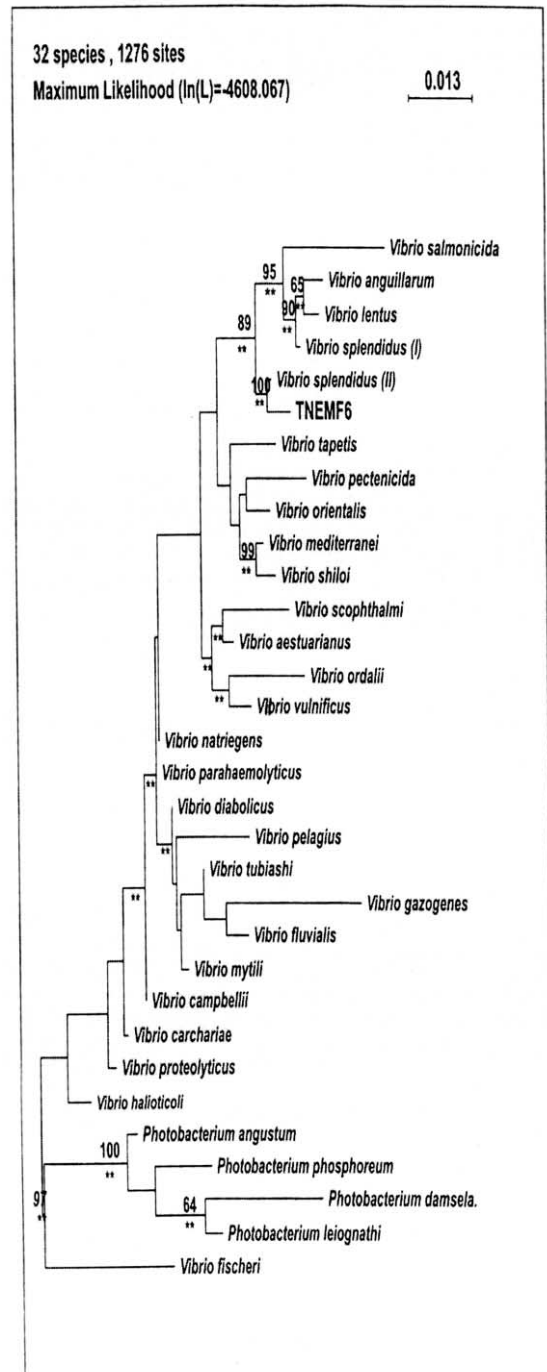


Tableau 4. Première série de pathologie expérimentale. Les différentes souches bactérienne isolées sur Zobell et TCBS ont été inoculées par balnéation au naissain de *Crassostrea gigas*. La concentration de l'inoculum est déterminée par dénombrement sur boîte Zobell et donné en bactéries par ml. Après 48 h d'incubation et rinçage, le naissain est élevé en bac de 20 l pendant deux mois. Une surveillance régulière des animaux permet d'obtenir le taux de mortalité cumulé au cours de cette période (taux de mortalité bac). Dans un second temps, certains lots sont sélectionnés et élevés en aquarium de 3 l. Le taux de mortalité donné correspond à trois semaines d'élevage.

Souches	Genre, espèce	Concentration	Mortalité bac	Mortalité aquarium
Néant			0%	6%
Néant			2%	
Néant			8%	
Néant			12%	
Néant			6%	
Néant			8%	
MNEF1	<i>Vibrio anguillarum</i>	3 10 ⁸	6%	
MNEF2	<i>Vibrio splendidus II</i>	10 ⁶	10%	12%
MNEF3	<i>Agrobacterium</i> sp.	4 10 ⁷	6%	
MNEF5	<i>Cytophaga</i> sp.	10 ⁸	2%	5%
MNEF6	<i>Cytophaga</i> sp.	4 10 ⁸	0%	
TNEMF1	<i>Vibrio fluvialis</i>	4 10 ⁶	2%	
TNEMF2	<i>Vibrio mediterranei</i>	4 10 ⁶	2%	
TNEMF3	<i>Vibrio pelagius I</i>	8 10 ⁶	6%	
TNEMF5	<i>Vibrio mediterranei</i>	3 10 ⁶	2%	
TNEMF6	<i>Vibrio splendidus II</i>	2 10 ⁷	18%	80%
TNEMF7	<i>Agrobacterium</i> sp.	3 10 ⁷	2%	
TNEMF8	<i>Vibrio splendidus II</i>	4 10 ⁷	4%	
CRL10	<i>Vibrio tubiashi</i>	4 10 ⁶	80%	76%
CRL22	<i>Vibrio tubiashi</i>	5 10 ⁷	10%	

des épisodes de mortalité. Dans ce travail, nous présentons l'isolement d'une souche bactérienne potentiellement pathogène pour le naissain d'huîtres creuses en France. Jusqu'à présent, la pathogénicité de souches bactériennes sur *C. gigas* a été démontrée, soit par infection d'animaux adultes, soit par infection de larves après immersion [5–11]. Ici, pour la première fois, il a été possible d'induire expérimentalement des mortalités de naissain d'huîtres creuses *C. gigas* par balnéation.

Cette souche a été isolée à partir d'animaux de captage naturel et échantillonnés au cours d'un épisode de mortalité estivale (Tableau 4). D'après les études phénotypiques et génotypiques, cette souche (TNEMF6) appartient à l'espèce *Vibrio splendidus* biovar II. Les autres souches de *Vibrio splendidus* II isolées sont peu virulentes (exemple de MNEF2) ou non virulentes (exemple de TNEMF8). Les *Vibrio splendidus* sont très répandus dans le milieu marin et plusieurs études en font état [21–23]. À l'intérieur de cette espèce ubiquiste, peu de souches sont virulentes. Par ailleurs, la classification dans une même espèce de toutes ces souches devrait être réexaminée à la lumière de la phylogénie moléculaire (Fig. 1) qui suggèrent l'existence de groupes distincts. Seules des hybridations ADN/ADN entre des souches représentatives de ces ensembles permettront de vérifier s'ils correspondent à une ou plusieurs espèces différentes.

D'autres souches de *Vibrio splendidus* ont été associées à des mortalités de larves *C. gigas* [10], de coquilles Saint-Jacques *Pecten maximus* [24] ou de poissons [25]. Pour ces différents modèles animaux, on observe une grande diversité de virulence entre souches appartenant à la même espèce. Actuellement le seul moyen d'établir la virulence d'une souche bactérienne est de la tester en pathologie expérimentale. Cette approche reste lourde et les résultats sont variables d'un essai à l'autre. Nous ne disposons pas de critères phénotypiques ou génotypiques, sur la base desquels il soit possible de détecter un *Vibrio splendidus* pathogène. Des études de typage moléculaire de différentes souches basées sur les profils de restriction des gènes ribosomiques (ribotypage) ou la RAPD n'ont pas permis de trouver un marqueur de la pathogénicité [Waechter, communication personnelle, p. 25]. Nous désirons à présent développer des outils diagnostic spécifiques de facteurs de virulence. Notre démarche s'appuiera sur l'établissement d'une collection de souche de *Vibrio splendidus*, la soustraction génomique entre souche virulente et non virulente et clonage des gènes supports de virulence. En parallèle, des modèles in vitro seront développés pour tester la virulence de ces bactéries.

Un autre résultat intéressant de ce travail est la variabilité de virulence des souches pathogènes, en fonction des expériences d'épreuve. Dans notre étude, le naissain infecté par *Vibrio tubiashi* (CRL10) subit

une mortalité de 80% en bac de 20 l dans la première expérience, alors que, dans la seconde expérience, il ne subit qu'une mortalité évaluée à 12%. Au cours de la première expérience, les naissains infectés par *Vibrio tubiashi* (CRL22) et *Vibrio splendidus* TNEMF6 présentent, après deux mois d'élevage en bac, des mortalités de l'ordre de 10%, puis, après un mois de culture en aquarium, une mortalité de 80%. En revanche, cet effet activateur du pouvoir pathogène par changement de la pratique d'élevage n'est pas observé pour la souche *Vibrio splendidus* MNEF2. Il semble donc que

l'origine du naissain, le mode d'élevage ainsi que la souche de *Vibrio* soient des facteurs déterminants.

Ces résultats rejoignent ceux de l'étude des mortalités estivales sur le terrain, qui indiquent une étiologie multifactorielle de ce phénomène, effet concomitant de conditions environnementales, de paramètres physiologiques, génétiques et pathologiques. Afin de relier notre étude en bactériologie au phénomène des mortalités anormales, nous nous proposons, dans une étude ultérieure, de tester la virulence de nos souches en pathologie expérimentale avec des animaux de familles génétiquement différentes et en conditions environnementales différentes.

Remerciements. Les auteurs remercient la société Grainocéan pour son soutien technique et financier (bourse Cifre), ainsi que le Laboratoire communautaire de référence pour les maladies des mollusques. Nous remercions M. Tristan Renault et Melle Mélanie Gay d'avoir corrigé ce manuscrit.

Références

- [1] P. Gouletquer, P. Soletchnik, O. Le Moine, D. Razet, P. Geairon, N. Faury, S. Taillade, Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oléron (France), Ices Statutory Meeting, Population Biology, Mariculture Committee CM (1998) CC14–CC20.
- [2] J.L. Nicolas, M. Comps, N. Cochenec, Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 12 (1992) 11–13.
- [3] T. Renault, R.M. Le Deuff, N. Cochenec, B. Chollet, P. Maffart, Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: a comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae, Vet. Res. 26 (1995) 539–543.
- [4] R.M. Le Deuff, J.L. Nicolas, T. Renault, N. Cochenec, Experimental transmission of herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 142 (1994) 69–72.
- [5] R.A. Elston, L. Leibovitz, Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oysters, *Crassostrea virginica*, Can. J. Fish Aquat. Sci. 37 (1980) 964–978.
- [6] C. Brown, A study of two shellfish-pathogenic *Vibrio* strains isolated from a Long Island hatchery during a recent outbreak of disease, J. Shellfish Res. 1 (1981) 83–87.
- [7] V.E. Jeffries, Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*, Aquaculture 29 (1982) 201–226.
- [8] H.S. Hada, P.A. West, J.V. Lee, J. Stemmler, R.R. Colwell, *Vibrio tubiashi* sp. nov., a pathogen of bivalve molluscs, Int. J. Syst. Bacteriol. 34 (1984) 1–4.
- [9] R.A. Elston, J.H. Beattie, C. Friedman, R. Hedrick, M.L. Kent, Pathology and significance of fatal inflammatory bacteraemia in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, J. Fish Dis. 10 (1987) 121–132.
- [10] G. Sugumar, T. Nakai, Y. Hirata, D. Matsubara, K. Muroga, *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae, Dis. Aquat. Org. 33 (1998) 111–118.
- [11] C.F. Dungan, R.A. Elston, M.H. Schiewe, Evidence for colonization and destruction of hinge ligaments in cultured juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) by *Cytophaga*-like bacteria, Appl. Environ. Microbiol. 55 (1989) 1128–1135.
- [12] J.G. Holt, N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, S.T. Williams, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, 1994.
- [13] M. Alsina, A.R. Blanch, A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species, J. Appl. Bacteriol. 76 (1994) 79–85.
- [14] J.D. Oliver, Taxonomic scheme for the identification of marine bacteria, Deep-Sea Res. 29 (1982) 795–798.
- [15] H.S. Tubiash, P.E. Chanley, E. Leifson, Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. I. Etiology and epizootiology, J. Bacteriol. 90 (1965) 1036–1044.
- [16] H.S. Tubiash, R.R. Colwell, R. Sakazaki, Marine *Vibriosis* associated with bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile Bivalve Mollusks, J. Bacteriol. 103 (1970) 272–273.
- [17] H.S. Tubiash, Bacterial pathogens associated with cultured bivalve mollusk larvae, in : W.L. Smith, M.H. Chanley (Eds.), Culture of marine invertebrates animals, 1996, p. 61.
- [18] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor University Press, 1989.
- [19] T. Renault, R.M. Le Deuff, C. Lipart, C. Delsert, Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France, J. Virol. Meth. 88 (2000) 41–50.
- [20] M. Comps, J.R. Bonami, Infection virale associée à des mortalités chez l'huître *Crassostrea angulata* Th., C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D 285 (1962) 1139–1140.
- [21] R. Farto, M. Montes, M.J. Perez, T.P. Nieto, J.L. Larsen, K. Pedersen, Characterization by numerical taxonomy and ribotyping of *Vibrio splendidus* biovar I and *Vibrio scophthalmi* strains associated with turbot cultures, J. Appl. Microbiol. 86 (1999) 796–804.
- [22] K.H. Neelson, B. Wimpee, C. Wimpee, Identification of *Vibrio splendidus* as a member of the planktonic luminous bacteria from the Persian Gulf and Kuwait region with luxA probes, Appl. Environ. Microbiol. 59 (1993) 2684–2689.
- [23] M.C. Macian, E. Garay, F. Gonzalez-Candelas, M.J. Pujalte, R. Aznar, Ribotyping of *Vibrio* populations associated with cultured oysters (*Ostrea edulis*), Syst Appl Microbiol. 23 (2000) 409–417.
- [24] J.L. Nicolas, S. Corre, G. Gauthier, R. Robert, D. Ansquer, Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture, Dis. Aquat. Org. 27 (1996) 67–76.
- [25] F.J. Gatesoupe, C. Lambert, J.L. Nicolas, Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, J. Appl. Microbiol. 87 (1999) 757–763.

Article 13 : Le Roux & al., 2002



Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events

Frédérique Le Roux ^{a,*}, Mélanie Gay ^a, Christophe Lambert ^b, Magali Waechter ^c,
Saravanne Poubalanne ^a, Bruno Chollet ^a, Jean-Louis Nicolas ^d, Franck Berthe ^a

^aLaboratoire de Génétique et Pathologie, Ifremer, 17390 La Tremblade, France

^bLaboratoire des Sciences de l'Environnement marin (LEMAR), Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM),
Université de Bretagne Occidentale (UBO), Place Copernic, technopole Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

^cÉcloserie Grainocéan, 14 cours Dechézeaux, 17410 Saint Martin de Ré, France

^dLaboratoire de Physiologie des Invertébrés marins, Ifremer, 29280 Plouzané, France

Received 8 October 2001; accepted 29 May 2002

Abstract

French mollusc production is based mainly on the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*. Since 1991, annual mass mortality of juveniles has been reported during summer months. These recurring episodes concern professionals who fear that like Portuguese oyster, *C. angulata*, *C. gigas* could in turn disappear following one of these epizooties. Previously, bacteriological analysis of moribund oyster juveniles yielded an isolate of a *Vibrio splendidus* biovar II strain, named TNEMF6. This isolate was demonstrated to be pathogenic to *Crassostrea gigas* spat by experimental challenge. To study the association between summer oyster mortality and presence of TNEMF6 cluster strains, Vibrionaceae fauna were isolated from infected spat along the French Atlantic coast between 1997–1998. Strains related to *V. splendidus* biovar II were selected. Comparison with TNEMF6 was performed by classical biochemical tests and polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of SSU rDNA, *rpoD*, and *gyrB* genes. Genomic similarities were confirmed by DNA/DNA hybridization. Only one strain out of 14, TNNIII7, was found to be closely related to the pathogenic bacteria. Neither the phenotypic nor the genotypic markers used in this study were able to distinguish pathogenic from non-pathogenic strains of the widespread *V. splendidus*. However, future genetic comparisons of TNEMF6 and TNNIII7 is likely to reveal genes involved in pathogenicity. © 2002 Ifremer/CNRS/Inra/IRD/Cemagref/Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. All rights reserved.

Résumé

Comparaison de souches apparentées à *Vibrio splendidus* biovar II isolées lors d'épisodes de mortalité d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*. La production française de mollusques est principalement basée sur la culture d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*. Depuis 1991, en période estivale, de forts taux de mortalité de naissain d'huîtres creuses sont observés régulièrement en milieu naturel et en écloseries. Ces épisodes récurrents inquiètent les professionnels qui craignent qu'à l'instar de l'huître portugaise, *C. angulata*, *C. gigas* puisse disparaître à son tour, suite à une épizootie. Différentes souches bactériennes appartenant au genre *Vibrio* ont été associées à des mortalités de mollusques. Récemment, nous avons isolé une souche *Vibrio splendidus* biovar II, TNEMF6, pathogène de naissain d'huître creuse. Dans ce travail, nous avons recherché la présence de cette souche dans d'autres épisodes de mortalité estivale. La flore vibrionacée d'animaux sains et moribonds a été isolée et les souches apparentées à *Vibrio splendidus* biovar II ont été sélectionnées. Une comparaison des souches a été effectuée par phénotypage (39 tests biochimiques) et génotypage (PCR-RFLP SSU rDNA, *rpoD* et *gyrB*). Les homologies génomiques ont été confirmées par hybridation ADN/ADN. Seule, une souche sur 14, apparaît proche de ce vibrio pathogène. Cependant, les techniques phénotypiques et génotypiques utilisées dans ce travail ne permettent pas de distinguer les isolats pathogènes et non pathogènes. Cependant, les deux souches TNEMF6 et TNNIII7 vont être utilisées dans une approche de génomique comparative pour l'étude des supports moléculaires de la virulence. © 2002 Ifremer/CNRS/Inra/IRD/Cemagref/Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Keywords: Oyster mortality; PCR-RFLP; Epidemiology; Virulence; *Vibrio splendidus*

* Corresponding author.

E-mail address: fleroux@ifremer.fr (F. Le Roux).

1. Introduction

Currently, French shellfish production is based mainly on the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas* (130 000 t.y⁻¹). The spat used in oyster farms are traditionally collected from natural sites; however hatchery production contributes approximately 10 to 15% of the total spat production.

Since 1991, and principally during summer as the water temperature increases, recurrent *C. gigas* spat mortality (60 to 100%) has occurred in the field and in hatcheries. Summer mortality is a major concern for the world's oyster industry. Studies indicate a complex etiology including several factors: environmental conditions, infectious agent, physiology and genetic of the host (Gouletquer et al., 1998).

Several bacterial strains, mainly *Vibrio* sp., have been recognized as pathogenic for bivalve species including the Pacific oyster (Elston and Leibovitz, 1980; Brown, 1981; Jeffries, 1982; Hada et al., 1984; Elston et al., 1987; Dungan et al., 1989; Sugumar et al., 1998; Lacoste et al., 2001). Since 1995, we have studied bacterial strains associated with oyster mortality. A strain isolated from wild spat sampled during a mortality outbreak, TNEMF6, was demonstrated to be pathogenic by experimental exposure of spat to a bacterial suspension. This strain was identified by phenotypic and genotypic characteristics as *Vibrio splendidus* biovar II (Waechter et al., 2002).

In the present work, we studied the association between mortality outbreaks and presence of TNEMF6. Strains of the genus *Vibrio* were isolated during oyster mortality outbreaks occurring along the French coast. *Vibrio splendidus* biovar II strains were selected on the basis of their phenotype. Comparison between selected *Vibrio* and TNEMF6 was performed by biochemical testing and genotyping.

In the modern taxonomy of bacteria, the phylogenetic analysis of SSU rRNA gene sequences is a standard method to investigate phylogenetic relationships among organisms. However, the clustering of strains based on SSU rDNA sequences are not always correlated with the degree of DNA homology determined by DNA/DNA hybridization which has been used as the benchmark criterion for the definition of bacterial species (Fox et al., 1992; Stackebrandt and Goebel, 1994). To resolve the phylogenetic relationships of closely related organisms, sequences of another gene than the SSU rRNA gene must be chosen to have a higher resolution. Phylogenetic analysis using the genes *gyrB* and *rpoD* sequences was shown to provide higher resolution than the one using the SSU rDNA sequence (Yamamoto and Harayama, 1998). Here we performed polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) on SSU rDNA, *rpoD* and *gyrB* to genotype the *Vibrio splendidus* biovar II related strains. Results were confirmed by DNA/DNA hybridization. Selected strains were then tested for their pathogenic abilities after injection to oysters (*C. gigas*) and clams (*Ruditapes philippinarum*).

2. Material and methods

2.1. Reference strains

Vibrio splendidus biovar II strain TNEMF6, was deposited in the "Collection Nationale de Cultures de Microorganismes" (CNCM) of the Pasteur Institute as accession number I-2385 the 24 February 2000.

Two reference strains are included in this study: *V. splendidus* biovar II (Laboratory of Microbiology, Gent, Belgium: LMG 10952) and *V. anguillarum* (Collection of Pasteur Institute Paris, France: CIP 6336). The strains were confirmed to possess the key characteristics of the taxon (Alsina and Blanch, 1994).

2.2. *Vibrio* isolation from spat groups suffering "summer mortality"

In 1997 and 1998 moribund spat in groups suffering "summer mortality" syndrome were collected from the field and hatcheries (Table 1). Bacterial strains were obtained from flesh ground in sterile sea water and spread out over TCBS agar (thiosulfate citrate bile sucrose; Diagnostic Pasteur, Marne la Coquette, France) specific for the Vibrionaceae flora. Plates were incubated 24 h at 20 °C. Pure cultures were obtained by streaking and re-streaking on fresh media.

2.3. *Vibrio splendidus* biovar II selection

Vibrio splendidus biovar II strains were selected after the completion of a set of phenotypic tests: Gram staining reaction (Gram Kit; BioMérieux, Marcy l'Etoile, France); oxidase (Bactident oxidase; Merck, Darmstadt, Germany); respiratory activity (meat liver medium; Diagnostic Pasteur); and API 20E (BioMérieux) according to the manufacturer's instructions with the modifications suggested by MacDonnell et al. (1982), namely 2% NaCl was added to the bacterial suspension.

According to Alsina and Blanch (1994), *V. splendidus* biovar II strains should be Gram negative, oxidase positive, facultative anaerobes; These strains were arginine dihydrolyase, lysine decarboxylase and ornithine decarboxylase negative; and either (1) indole positive, gelatinase positive, no growth at 35 °C and D-glucosamine negative or (2) indole negative, NO₂ production positive, L arabinose negative, sucrose acidification negative.

2.4. Phenotypic comparison

The phenotypes of selected strains were compared using the following biochemical tests (Maury, 1987): gelatinase; urease; β-galactosidase; utilization of citrate; acetoin production (Voges-Proskauer reaction); nitrate reduction; H₂S production and acidification of lactose, glucose, arabinose, mannitol, and sucrose (API 20E, bioMérieux); glucose

Table 1
Vibrio splendidus biovar II related strains isolated from moribond spat suffering of « summer mortality » syndrome and collected from field or hatcheries at the indicated period.

Date	Origin	Site of sampling	Mortality (%)	<i>V. splendidus</i> detected
1 July 1997	Wild	Open sea (Charente)	10	TNEMC5 TNEMC8
16 July 1997	Wild	Open sea (Charente)	30	TNEMD3 TNEMD3'
16 September 1997	Wild	Open sea (Charente)	60	TNEMF6 TNEMF8
19 June 1998	Hatchery	Open sea (Charente)	0 (strong smell)	TNEMIII3 TNEMIII4 TNEMIII6
11 July 1998	Hatchery	Nursery	10	TNNIII7
25 July 1998	Hatchery	Nursery	10	TNNIV9
22 September 1998	Wild	Open sea (Bretagne)	50	TNMB4 TNMB5 TNMB6 TNMB7

metabolism (MEVAG, Diagnostic Pasteur); respiratory metabolism (Meat liver medium; Diagnostic Pasteur); motility; NaCl requirement and tolerance (0, 6, 8, 10% w/v); temperature tolerance (4, 20, 35 and 40 °C) in 1.5% (w/v) peptone broth (Diagnostic Pasteur); presence of flagellae detected according to the method described by Mayfield and Inniss (1977); luminescence detected on marine agar (Diagnostic Pasteur) supplemented with 10% (v/v) glycerol.

2.5. PCR-RFLP

Bacterial strains were cultured in brain heart medium (Diagnostic Pasteur) for 8 h at 20 °C and pelleted by centrifugation for 15 min at 5 000 rpm. Lysis was performed overnight at 50 °C in NaCl 100 mM, EDTA 25 mM pH 8, SDS 0.5% and proteinase K 100 µg.ml⁻¹ (1 ml of lysis buffer/10⁸ bacteria). Nucleic acids were extracted using a standard phenol/chloroform protocol and precipitated with ethanol (Sambrook et al., 1989). Nucleic acids were dissolved in TE buffer and incubated with RNase (100 µg.ml⁻¹) at 37 °C for 15 min. DNA was again organic extracted, precipitated, and dissolved as described above.

PCR amplification of SSU rRNA, *gyrB* and *rpoD* was done following the methods described previously (Yamamoto et Harayama, 1998; Lambert et al., 1998). Universal primers details are given in Table 2. PCR reactions were carried out in 50 µl according to the standard conditions for Silver-star *Taq* DNA polymerase (Eurogentec, Seraing,

Belgium). After denaturation of DNA at 94 °C for 5 min, 30 cycles were run with an MJ-Research thermocycler (Poly-labo, Strasbourg, France) as follows: denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 50 °C (SSU rRNA) or 58 °C (*gyrB* and *rpoD*) for 1 min, and elongation at 72 °C for 1 min per kbp. A final elongation step of 10 min at 72 °C was performed. Amplified products were analyzed electrophoretically on 1% agarose gels.

Polymorphisms among the PCR products were identified by cleavage with *MboI* or *HhaI* (Promega). The resulting restriction fragments were analyzed electrophoretically on 2% agarose gels.

2.6. DNA/DNA hybridization

Quantitative DNA/DNA hybridization was performed by a non-radioactive dot-blot method (Cardinali et al., 2000; Macian et al., 2001). DNA was extracted as described above with an additional step of ultracentrifugation through a cesium chloride gradient (Sambrook et al., 1989).

Probe preparation: DNA solutions were photo-labelled using the kit ECL RPN 3040 according to the manufacturer's instructions (Amersham).

Target preparation: DNAs were denatured in NaOH 1N for 5 min at 4 °C, neutralised in Na₂HPO₄ 1N, and deposited on a Hybond N membrane (Amersham) in 3 replicates (300 ng DNAs each) with a dot blot system (SRC 96 D

Table 2
 Polymerase chain reaction, primers used in this study. bp : length in base pair; T: hybridization temperature given in °C.

Primer	Target	Sequence (5'-3')	bp	T (°C)	Position in <i>E. coli</i>
AS dir	16S	AGAGTTTGATCATGGCTCAGA	21	50	8-28
S17 rev	16S	GTTACCTTGTTACGACTT	18	50	1493-1509
UP-1E	<i>gyrB</i>	CAGGAAACAGCTATGACCAYGSNGGNGGNAARTTYRA	37	58	335-355
APrU	<i>gyrB</i>	TGTAAAACGACGGCCAGTGCNNGRATCYTTTYTCYTGRCA	38	58	1482-1502
70F	<i>rpoD</i>	ACGACTGACCCGGTACGCATGTAYATGMNGARATGGGNACNGT	44	58	300-324
70R	<i>rpoD</i>	ATAGAAATAACCGACGTAAGTTNGCYTCNACCATYTCYTTYTT	44	58	1128-1149

Minifold I, Schleider & Schüll). DNAs were then fixed to the membrane by UV crosslinking.

Hybridization: Membranes were placed in hybridization bottles with 20 ml of hybridization buffer (supplied by Amersham, ECL kit) and 50 µl of denatured labelled probe were added. Hybridization was performed at 60 °C for 20 h. The membranes were washed twice (15 min at 60 °C) in SSC 1X/SDS 0.1% and 10 min in SSC 0.5 X/SDS 0.1%. Membranes were then blocked (liquid block supplied in the kit ECL RPN3040) and incubated with anti-fluorescein-HRP conjugate (Amersham). Finally detection of bound peroxidase was made using the ECL detection reagents (Amersham). Consequently, due to luminol oxidation, light was emitted in proportion to hybridization. Chemiluminescence was detected and quantified using a FLUOR-S™ Multil-imager BIO-RAD equipped with a Nikon 50 mm lens. Results were treated by the Multi-analyst software (BIO-RAD). Mean of chemiluminescence level (cpm.mm⁻²) reached by the 3 replicates of homologous DNAs was considered as 100% re-association rate, and level reached by herring sperm DNA as 0%. The membranes were first hybridized with the labelled TNEMF6 probe. After reading the chemiluminescence, they were stripped (one rinse in SSC 5X and 2 h wash in SDS 0.1% solution previously heated to 100 °C) and subsequently rehybridized using the labelled LMG 10952 probe.

2.7. Experimental challenge

Bacteria were grown at 20 °C for 24 h in marine broth (Diagnostic Pasteur). Bacterial cultures were centrifuged 15 min at 5 000 rpm and harvested in sterile seawater at a concentration of 1-2 10⁸ CFU.ml⁻¹ achieved by means of a spectrophotometer. The bacterial concentration was confirmed by enumeration on marine agar plates.

Adult clams, *R. philippinarum*, originated from the SatMar nursery (St Just Luzac, France) and measured between 3-5 cm. A volume of 100 µl of bacterial suspension (i.e. 10⁷ CFU) was inoculated by injection into the adductor muscle. For each strain, a group of 50 animals was injected. A negative control consisted of a group of 50 clams injected with sterile seawater. The clams were held out of water overnight at 18 °C and were then kept for one week in aerated seawater (50 clams in 2.5 l) at 18 °C. Mortality was recorded twice a day. Water change and feeding with phytoplankton (*Chaetoceros calcitrans*) occurred every other day.

Oyster's spat, *C. gigas*, originated from the IFREMER nursery (La Tremblade, France) and measured 4-6 cm. To anaesthetize and open valves, the spat were first kept for 2 h in seawater supplemented with MgCl₂ at a final concentration of 50 g.l⁻¹. A volume of 50 µl of the bacterial suspension (i.e. 10⁷ CFU) was inoculated by injection into the adductor muscle. For each strain, a group of 36 animals was injected. Negative controls consisted of a group of 36 oysters injected with sterile seawater. Immediately after

Table 3

Phenotypic characteristics of *Vibrio splendidus* biovar II strains. Only the discriminant tests are mentioned. in grey TNEMF6 similar phenotype.

Strains	Indole	Citrate	ONPG	4°C	Lactose	Mannitol
TNEMC5	+	+	+	+	-	+
TNEMC8	+	+	-	+	+	-
TNEMD3	+	+	+	+	-	+
TNEMD3'	+	+	+	-	-	+
TNEMF6	+	+	-	-	-	+
TNEMF8	+	+	+	+	+	+
TNEMIII3	+	-	+	+	-	+
TNEMIII4	+	+	-	-	-	-
TNEMIII6	+	+	+	-	-	+
TNIII7	+	+	-	-	-	+
TNNIV9	+	+	+	nd	-	+
TNMB4	+	+	+	-	-	+
TNMB5	+	+	-	-	-	+
TNMB6	+	+	-	+	-	+
TNMB7	+	+	+	+	-	nd
LMG 10952	-	-	-	-	-	+

injection, oysters were transferred to aerated aquaria with seawater (36 oysters in 2.5 l) at 20 °C. Mortality was recorded daily. Feeding with phytoplankton (*Chaetoceros calcitrans*) occurred daily for one week.

3. Results

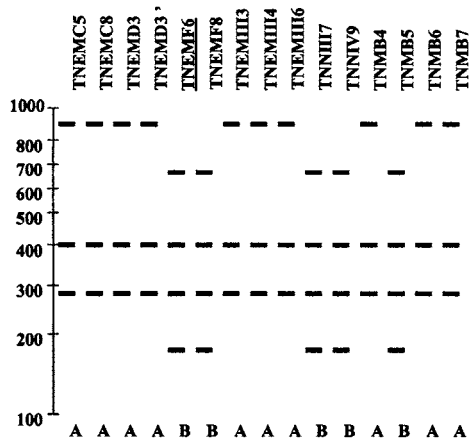
3.1. Phenotyping

Fourteen strains isolated from moribund oysters were selected and compared phenotypically to the pathogenic TNEMF6 strain (Table 1 and 3). Among 39 phenotypic tests used to compare the isolates, only 6 discriminated the selected strains: indole and citrate production, β-galactosidase production, growth at 4 °C, lactose and mannitol acidification. Two strains out of 14, TNNIII7 and TNMB5, exhibited 100% similarity with TNEMF6 and were discriminated from LMG 10952 (the *V. splendidus* biovar II type culture) by indole and citrate production.

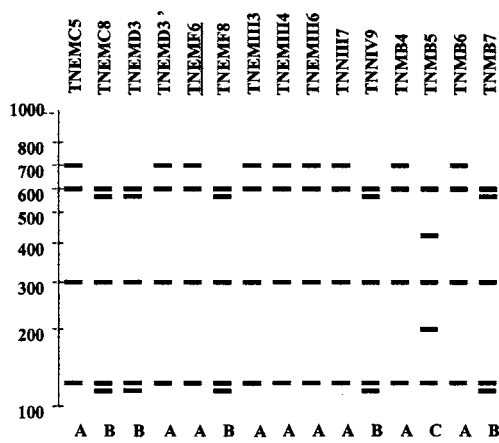
3.2. PCR-RFLP

Genotyping was carried out by PCR amplification of SSU rRNA, *rpoD*, and *gyrB* genes followed by digestion with *MboI* or *HhaI*. A schematic representation of fragment patterns obtained from each amplification and digestion is shown in Fig. 1 and results are summarized in Table 4. The number of patterns obtained was as follows: SSU rDNA-*MboI* (2 patterns), SSU rDNA-*HhaI* (3 patterns), *rpoD-MboI* (4 patterns), *rpoD-HhaI* (5 patterns), *gyrB-MboI* (6 patterns), *gyrB-HhaI* (10 patterns). Thus, an increased discrimination between strains was obtained by using respectively SSU rDNA - *rpoD* - *gyrB* and *MboI-HhaI* in PCR RFLP analysis. The pathogenic strain, TNEMF6, has a distinct genotype (BABBBE). Only TNNIII7 shared four patterns with TNEMF6 (SSU rDNA-*MboI*, *HhaI*, *rpoD-MboI* and *gyrB-HhaI*).

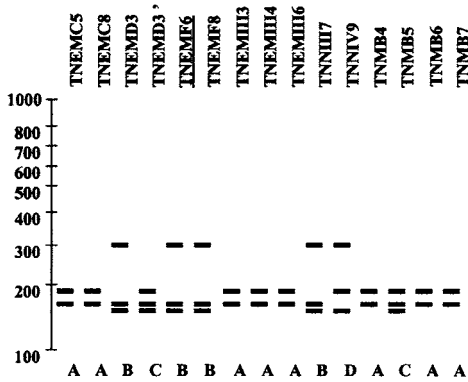
SSU rDNA *MboI*



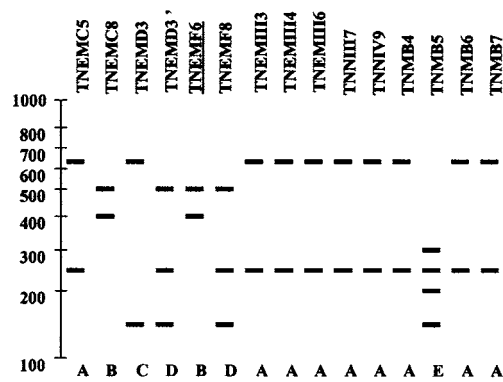
SSU rDNA *HhaI*



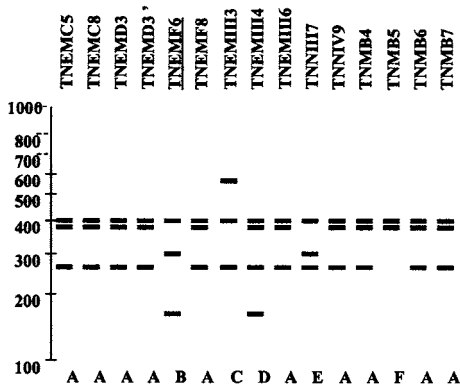
rpoD* *MboI



rpoD* *HhaI



gyrB* *MboI



gyrB* *HhaI

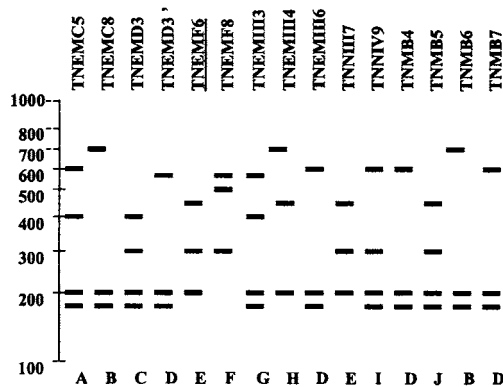


Fig. 1. Restriction fragment patterns of SSU rRNA, *rpoD* and *gyrB* genes digested by *MboI* and *HhaI*. Restriction fragments shorter than 100 base pairs were not used for analysis. Clustering per PCR-RFLP and strain are presented in Table 4.

Table 4

Summary of restriction fragment patterns of SSU ribosomal sub unit rRNA, *rpoD*, and *gyrB* amplicons digested by *MboI* and *HhaI*. * strains not discriminated by this battery of tests; in grey TNEMF6 similar patterns.

Strains	16S		<i>RpoD</i>		<i>GyrB</i>	
	<i>MboI</i>	<i>HhaI</i>	<i>MboI</i>	<i>HhaI</i>	<i>MboI</i>	<i>HhaI</i>
TNEMC5	A	A	A	A	A	A
TNEMC8	A	B	A	B	A	B
TNEMD3	A	B	B	C	A	C
TNEMD3'	A	A	C	D	A	D
TNEMF6	B	A	B	B	B	E
TNEMF8	B	B	B	D	A	F
TNEMIII3	A	A	A	A	C	G
TNEMIII4	A	A	A	A	D	H
TNEMIII6	A	A	A	A	A	D*
TNNIII7	B	A	B	A	E	E
TNNIV9	B	B	D	A	A	J
TNMB4	A	A	A	A	A	D*
TNMB5	B	C	C	E	F	K
TNMB6	A	A	A	A	A	B
TNMB7	A	B	A	A	A	D

3.3. DNA/DNA hybridization

Five strains (TNEMF6, TNNIII7, TNMB5, LMG 10952, CIP 6336) were submitted to DNA/DNA hybridization (Table 5). When using TNEMF6 DNA as a probe, TNNIII7 shared 92.5% homology and LMG 10952 80.4%. The use of LMG 10952 DNA as a probe corroborated these results: TNNIII7 shared 84.4% and TNEMF6 72.7%. On the opposite, TNMB5 showed only 42.3% homology with TNEMF6 probe and 46.3% with LMG 10952 probe. The DNA/DNA hybridization studies suggested close relationship among 3 strains, TNEMF6, TNNIII7 and LMG 10952. The outgroup represented by *V. anguillarum* (CIP 6336) exhibited 27.7% homology with TNEMF6 and 30.3% homology with LMG 10952.

3.4. Experimental challenge

Virulence of TNEMF6 and TNNIII7 was compared following injection into *C. gigas* spat and *R. philippinarum*. Two series of experiments were conducted. Clams were more sensitive to injection of sterile sea water and *Vibrio* than oysters. In *C. gigas*, TNEMF6 induced mortality (25%)

Table 5

Percentage of DNA/DNA hybridization with DNA of TNEMF6 and LMG 10952 as probes for *Vibrio splendidus* strains that exhibit strong homology to the pathogenic strain.

Target	Probe	
	TNEMF6 (%)	LMG 10952 (%)
TNEMF6	100	72.7
LMG 10952	80.4	100
TNNIII7	92.5	84.4
TNMB5	42.3	46.3
CIP 6336	27.7	30.3

after 4 days in only one experiment. In clams, TNEMF6 induced a higher rate of cumulative mortality in both experiment (81 and 53%). TNNIII7 appeared to be an avirulent strain in both hosts (Fig. 2).

4. Discussion

We compared strains isolated during mortality events to TNEMF6 biochemically and genomically. Although 14 strains were biochemically identified as *Vibrio splendidus* biovar II, only one, TNNIII7, was similar to TNEMF6. DNA/DNA hybridization confirmed that these two strains belong to the same species; however, TNNIII7 did not appear to be virulent. Although, the TNMB5 strain was 100% similar phenotypically to TNEMF6, it did not belong to the same species according to DNA/DNA hybridization. Therefore, phenotyping is not sufficient to identify *Vibrio splendidus* biovar II. A clarification of *Vibrio splendidus* taxonomy, based on a polyphasic approach, appears to be necessary (Waechter et al., 2002). Here we have shown that PCR-RFLP, based on the amplification of different genes of phylogenetic interest and cleavage with various restriction enzymes may be a useful tool in investigating *Vibrio splendidus* biovar II biodiversity and can be used to study distribution of these strains in environment.

The strain TNEMF6 was isolated from spat groups suffering a high rate of mortality. We do not yet know if the vibriosis observed in September 1997 (date of TNEMF6 isolation) was an epiphenomenon or if the strain is a causative factor in other mortality events but has gone undetected due to the sampling methods. Actually, due to the size of the animals, only the spat flesh was ground. The pathogenic strain can be masked by *Vibrio* harboured in the digestive tract, where they constitute the majority of bacteria (Prieur, 1982). Furthermore our sampling excluded bacteria attached to the shell surface although different authors have demonstrated the localisation of pathogenic *Vibrio* in compartments outside the soft tissues (Elston and Leibovitz, 1980; Elston et al., 1982; Paillard and Maes, 1990). *GyrB* PCR/RFLP pattern of TNEMF6 strain is unique among all tested strains. *GyrB* gene sequencing and alignment of a *Vibrio* collection are in progress in order to develop molecular tools to diagnose TNEMF6. Therefore, substantial advances can be made on genetic turf in detecting the TNEMF6 strain in order to associate or not this strain with oysters summer mortality.

However, our studies of such genes did not lead to the identification of pathogenicity. Here, TNEMF6 and TNNIII7 were phenotypically and genotypically very similar, whereas their virulence was markedly different. Therefore, we do not yet have any phenotypic or genotypic feature to distinguish pathogenic *V. splendidus* strains from non-pathogenic ones. *Vibrio splendidus* is widely distributed in marine ecosystems (Nealson et al., 1993; Farto et al., 1999; Macian et al., 2000). Different strains have been associated

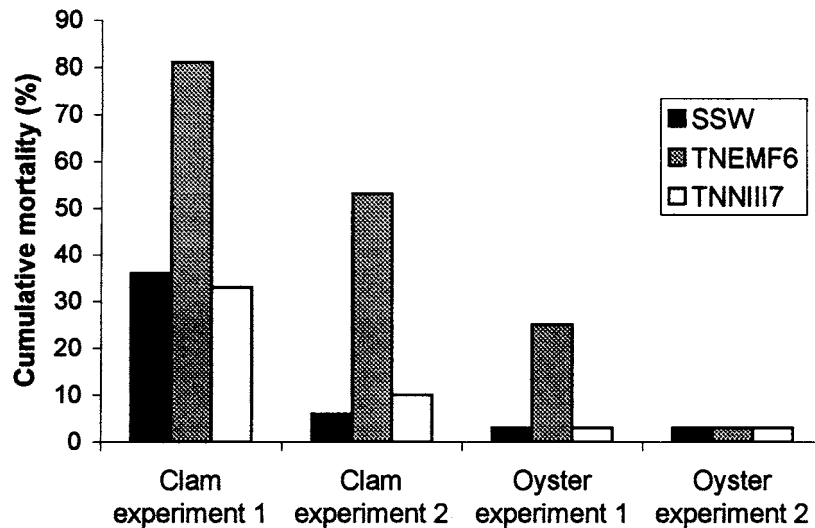


Fig. 2. Comparison of bacterial virulence measured as cumulative percentage mortality induced by experimental challenge 4 days after injection of TNEMF6 or TNNIII7 to *Crassostrea gigas* spat and clam *Ruditapes philippinarum*. Sterile sea water (SSW) was injected as a negative control.

with mortalities of *C. gigas* larvae (Sugumar et al., 1998), scallops larvae *Pecten maximus* (Nicolas et al., 1996), and fish larvae (Gatesoupe et al., 1999). A wide range of virulence among strains from the same species has been observed by experimental exposure on different animal models. Until now, the virulence of a strain has been assessed by experimental challenge, but this approach is time consuming and results may vary from one trial to another. Further development of this work should include the search for diagnostic tools specific of virulence factors. For example, the virulent TNEMF6 and avirulent TNNIII7 strains belonging to the same species could be compared in vitro to characterise virulence mechanisms. Genes involved could be screened by using degenerated oligonucleotides or genomic subtraction.

Other field studies indicated a complex etiology of summer mortalities with several factors implicated (Goulletquer et al., 1998). Therefore, it can be assumed that the background rate of mortality due to environmental conditions, physiology and genetics, can be moderated by an infectious agent which could play a role of opportunist rather than pathogen. Until now, only 3 infectious agents with potential pathogenicity have been detected in oyster spat groups experiencing summer mortality: (1) herpes-like virus (Renault et al., 1994; 1995), (2) *Vibrio splendidus* similar to SCB8 strain (Lacoste et al., 2001) and (3) *V. splendidus* biovar II (Waechter et al., 2002). The two strains of *Vibrio splendidus* induced mortalities of *C. gigas* spat under conditions of experimental challenge. Therefore, even if these infectious agents can not yet be considered as etiological agents of summer mortality, they can be used in experimental challenge to study the effect of environmental conditions, physiology and genetic factors on bacterial virulence and host response.

Acknowledgements

This study was carried out with financial assistance from Grainocean society (contract 97/5211243) and the Community Reference Laboratory (CRL). The authors acknowledge Jean François Auvray (SATMAR) for providing clams. The authors also thank Gwenaëlle Choquet and Raphael Brizard for their technical assistance and Professor Brian Austin for critically reading the manuscript.

References

- Alsina, M., Blanch, A.R., 1994. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 79–85.
- Brown, C., 1981. A study of two shellfish-pathogenic *Vibrio* strains isolated from a Long Island hatchery during a recent outbreak of disease. *J. Shell Res.* 1, 83–87.
- Cardinali, G., Liti, G., Martini, A., 2000. Non-radioactive dot-blot DNA reassociation for unequivocal yeast identification. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 931–936.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1128–1135.
- Elston, R.A., Leibovitz, L., 1980. Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oysters, *Crassostrea virginica*. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 37, 964–978.
- Elston, R., Elliot, E.L., Colwell, R.R., 1982. Conchiolin infection and surface coating *Vibrio*: shell fragility, growth depression and mortality in cultured oysters and clams, *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* and *Mercenaria mercenaria*. *J. Fish Dis.* 5, 265–284.
- Elston, R.A., Beattie, J.H., Friedman, C., Hedrick, R., Kent, M.L., 1987. Pathology and significance of fatal inflammatory bacteraemia in the Pacific oyster. *Crassostrea gigas* Thünberg. *J. Fish Dis.* 10, 121–132.
- 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. J. Appl. Microbiol. 86, 796–804.
- Fox, G.E., Wisotzky, J.D., Jurtshuk, P.J., 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 166–170.
- Gatesoupe, F.J., Lambert, C., Nicolas, J.L., 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). ICES Mariculture Committee CM1998/CC. pp. 14–21.
- Hada, H.S., West, P.A., Lee, J.V., Stemmler, J., Colwell, R.R., 1984. *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve mollusks. Int. J. Syst. Bacteriol. 34, 1–4.
- Jeffries, V.E., 1982. Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. Aquaculture 29, 201–226.
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cuff, A., Gélébart, F., Cordevant, C., Lange, M., Poulet, S.A., 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, J.L., Cilia, V., Corre, S., 1998. *Vibrio pectenecida* sp. nov. a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 481–487.
- MacDonnell, M.T., Singleton, F.L., Hood, M.A., 1982. Diluent composition for use of API 20E in characterising marine and estuarine bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 44, 423–427.
- Macian, M.C., Garay, E., Gonzalez-Candelas, F., Pujalte, M.J., Aznar, R., 2000. Ribotyping of *Vibrio* populations associated with cultured oysters (*Ostrea edulis*). Syst. Appl. Microbiol. 23, 409–417.
- Macian, M.C., Ludwig, W., Aznar, R., Grimont, P.A., Schleifer, K.H., Garay, E., Pujalte, M.J., 2001. *Vibrio lentus* sp. nov., isolated from Mediterranean oysters. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 1449–1456.
- Maury, M., 1987. Milieux et réactifs de laboratoire. Diagnostics Pasteur. 3rd ed. Paris, France.
- Mayfield, C.I., Inniss, W.E., 1977. A rapid, simple method for staining bacterial flagella. Can. J. Microbiol. 23, 1311–1313.
- Nealson, K.H., 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, J.L., Corre, S., Gauthier, G., Robert, R., Ansquer, D., 1996. Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. Dis. Aquat. Org. 27, 67–76.
- Paillard, C., Maes, P., 1990. Etiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum* : pathogénicité d'un *Vibrio* sp. C.R. Acad. Sci. Paris 310, 15–20.
- Prieur, D., 1980. The microflora of the digestive tract of marine bivalves: experimental study of the mussel, *Mytilus edulis*. International Malacological Congress. Perpignan, France.
- Renault, T., Cochenec, N., Le Deuff, R.M., Chollet, B., 1994. Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 14, 64–65.
- Renault, T., Le Deuff, R.M., Cochenec, N., Chollet, B., Maffart, P., 1995. Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea-gigas* a comparative-study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. Vet. Res. 26, 539–543.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Stackebrandt, E., Goebel, B.M., 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol. 44, 846–849.
- 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.
- Waechter, M., Le Roux, F., Nicolas, J.L., Marissal, E., Berthe, F., 2002. Caractérisation de bactéries pathogènes de naissains d'huître creuse *Crassostrea gigas*. C. R. Acad. Sci., Sér. III 325, 231–238.
- Yamamoto, S., Harayama, S., 1998. Phylogenetic relationships of pseudomonas putida strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 813–819.

Article 15 : Le Roux & al. 2004

Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences

Frédérique Le Roux^{1,*}, Mélanie Gay¹, Christophe Lambert², Jean Louis Nicolas³,
Manolo Gouy⁴, Franck Berthe¹

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

²Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), Université de Bretagne Occidentale (UBO),
Place Copernic, technopole Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

³Laboratoire de Physiologie des Invertébrés Marins, IFREMER, 29280 Plouzané, France

⁴Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, Unité Mixte de Recherche 5558, Centre National de Recherche Scientifique
(CNRS), Université Claude Bernard, Lyon, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France

ABSTRACT: Different strains related to *Vibrio splendidus* have been associated with infection of aquatic animals. An epidemiological study of *V. splendidus* strains associated with *Crassostrea gigas* mortalities demonstrated genetic diversity within this group and suggested its polyphyletic nature. Recently 4 species, *V. lentus*, *V. chagasii*, *V. pomeroyi* and *V. kanaloae*, phenotypically related to *V. splendidus*, have been described, although biochemical methods do not clearly discriminate species within this group. Here, we propose a polyphasic approach to investigate their taxonomic relationships. Phylogenetic analysis of *V. splendidus*-related strains was carried out using the nucleotide sequences of 16S ribosomal DNA (16S rDNA) and gyrase B subunit (*gyrB*) genes. Species delineation based on 16S rDNA-sequencing is limited because of divergence between cistrons, roughly equivalent to divergence between strains. Despite a high level of sequence similarity, strains were separated into 2 clades. In the phylogenetic tree constructed on the basis of *gyrB* gene sequences, strains were separated into 5 independent clusters containing *V. splendidus*, *V. lentus*, *V. chagasii*-type strains and a putative new genomic species. This phylogenetic grouping was almost congruent with that based on DNA–DNA hybridisation analysis. *V. pomeroyi*, *V. kanaloae* and *V. tasmaniensis*-type strains clustered together in a fifth clade. The *gyrB* gene-sequencing approach is discussed as an alternative for investigating the taxonomy of *Vibrio* species.

KEY WORDS: Phylogenetic · *GyrB* · *Vibrio splendidus* · Polyphyletic · Taxonomy

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). Several strains have been associated with mortalities of larvae or spat of the scallop *Pecten maximus* (Nicolas et al. 1996), the turbot *Scophthalmus maximus* (Gatesoupe et al. 1999) and the oyster *Crassostrea gigas* (Sugumar

et al. 1998, Lacoste et al. 2001, Waechter et al. 2002). An epidemiological study of *V. splendidus* strains associated with *C. gigas* summer mortalities demonstrated the important genetic diversity within this group and suggested its polyphyletic nature (Le Roux et al. 2002). Recently, 4 species (*V. lentus*, *V. chagasii*, *V. pomeroyi* and *V. kanaloae*, phenotypically closely related to *V. splendidus*) have been described (Macian et al. 2001, Thompson et al. 2002, 2003a,b). Given the difficulty in

identifying these species by means of biochemical methods and tests currently available, the development of genomic methods, congruent with a quantitative DNA–DNA hybridisation method, appeared to be necessary in a polyphasic approach towards species delineation.

Although 16S rDNA sequence analysis is a standard method to hierarchically order prokaryotic taxa among the ranks of genera and kingdoms (Garrity & Holt 2001, Ludwig & Klenk 2001, Stackebrandt et al. 2002), results of the 16S rDNA-based analysis often do not correlate with DNA–DNA hybridisation, currently recognised as the master criterion for definition of bacterial species (Fox et al. 1992, Stackebrandt & Goebel 1994). While the ability to translate DNA to protein sequences permits phylogenetic analysis of distantly related strains and more accurate sequence alignment (Gupta 1998), use of protein-coding genes may have several advantages over rDNA. Higher levels of sequence variation allow differentiation of closely related strains (Ochman & Wilson 1987). DNA gyrase subunit, *gyrB*, is a Type II topoisomerase found in bacteria. Since 1995, when universal primers for this gene

became available, several publications have suggested that *gyrB* provides suitable sequence data for bacterial phylogenies, possessing essential attributes such as limited horizontal transmission and presence in all bacterial groups (Yamamoto & Harayama 1995, Watanabe et al. 2001).

In this study, phylogenetic analysis of *Vibrio splendidus*-related strains was carried out by means of biochemical identification, *gyrB* and 16S rDNA-gene sequence analyses and quantitative DNA–DNA hybridisation.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. The 19 strains used in this study are presented in Table 1 and were isolated from scallops *Pecten Maximus*, turbot *Scophthalmus maximus* and oysters *Crassostrea gigas* during mortality outbreaks, or purchased from national collections (LMG: Laboratorium voor Mikrobiologie, Gent, Belgium; CIP: Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France). Strains were maintained on marine agar 2216 (Difco) at 4°C or stored frozen in marine broth 2216 (Difco) supplemented with 10% (v/v) glycerol (Sigma) at –80°C. Incubations and sub-cultures were at 20°C on marine agar 2216 (Difco). Strains are maintained in the European Community Reference Laboratory for Molluscs Diseases as part of the collections (Centre de Ressources Biologiques, Laboratoire de Génétique et Pathologie, Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer [Ifremer], La Tremblade, France).

Phenotypic characterisation. Phenotypic profiles of strains were determined with classical biochemical tests: Gram-staining (Gram kit; Biomerieux); oxidase (bactident oxidase; Merck); respiratory activity (meat liver medium; Diagnostic Pasteur); commercial kits API 20E and API 50CH (Biomerieux); glucose metabolism (MEVAG, Diagnostic Pasteur); motility; NaCl requirement and tolerance (0, 2, 4, 6, 8, 10% w/v) and temperature tolerance (4, 20, 35 and 40°C) were performed in 1.5% (w/v) peptone broth (Diagnostic Pasteur).

Tests were coded as 1 (positive result) or 0 (negative result) and numerical analysis was performed using

Table 1. *Vibrio* spp. strains used in this study and EMBL database accession no. In cases where 2 different sequences were obtained for a single strain, these are labelled a and b. LMG: Laboratorium voor Mikrobiologie, Gent, Belgium; CIP: Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France; *P. m.*: *Pecten maximus*; *S. m.*: *Scophthalmus maximus*; *C. g.*: *Crassostrea gigas*; *N. n.*: *Nodipeecten nodosus*; *O. e.*: *Ostrea edulis*

Strain designation	Identification	Source	Accession no.	
			16S	<i>gyrB</i>
LMG 4042 ^T	<i>V. splendidus</i>	Marine fishes	a:AJ515229 b:AJ515230	AJ515292
PMV18	<i>V. splendidus</i>	<i>P. m.</i> larvae	AJ515224	AJ515284
PMV19	<i>V. splendidus</i>	<i>P. m.</i> larvae		AJ577816
A515	<i>V. splendidus</i>	<i>P. m.</i> larvae	a:AJ515222 b:AJ515223	AJ515283
LT06	<i>V. splendidus</i>	<i>P. m.</i> larvae	AJ515221	AJ515282
CIP107166 ^T	<i>V. lentus</i>	<i>O. e.</i>	AJ294421	AJ515293
VS6 turb	<i>V. lentus</i>	<i>S. m.</i> larvae	AJ515228	AJ515288
A053	<i>V. lentus</i>	<i>P. m.</i> larvae	a:AJ515225 b:AJ515226	AJ515286
VC1	<i>V. lentus</i>	<i>P. m.</i> larvae	AJ515227	AJ515287
LMG 21353 ^T	<i>V. chagasii</i>	<i>S. m.</i> larvae	AJ316199	AJ577820
TNEMF6	<i>V. chagasii</i>	<i>C. g.</i> spat 1997	AJ515218	AJ515264
TNNIII7	<i>V. chagasii</i>	<i>C. g.</i> spat 1997	AJ515219	AJ515265
LMG 16745	<i>V. chagasii</i>	Marine fishes		AJ515278
LMG 20537 ^T	<i>V. pomeroiyi</i>	<i>N. n.</i>	AJ491290	AJ577822
LMG 20539 ^T	<i>V. kanaloae</i>	<i>O. e.</i>	AJ316193	AJ577821
LMG 20012 ^T	<i>V. tasmaniensis</i>	Marine fishes	AJ316192	AJ577823
Mel 13	Unknown	<i>C. g.</i> spat 2001		AJ577817
Mel 107	Unknown	<i>C. g.</i> spat 2001		AJ577818
Mel 108	Unknown	<i>C. g.</i> spat 2001		AJ577819

simple matching coefficients (Sneath 1972) and an unweighted pair-group method (Sneath & Sokal 1973).

Extraction of genomic DNA, amplification, cloning and sequencing of DNA. Genomic DNA was prepared according to Sambrook et al. (1989). PCR amplification of 16S rDNA and *gyrB* was achieved with primers, and following methods previously described (Yamamoto & Harayama 1995, Lambert et al. 1998). Amplified products were inserted in the pCR2.1 Vector System (Invitrogen) and used to transform *Escherichia coli* cells. We selected 2 to 4 colonies per strain and gene; minipreps of recombinant plasmids were performed according to standard alkaline-lysis protocols, with an additional phenol/chloroform extraction step and ethanol precipitation (Sambrook et al. 1989). Sequencing was carried out using the Sequiterm Excell II kit (Epicentre) and a Li-cor DNA sequencer (ScienceTec) according to the manufacturer's instruction.

Phylogenetic analyses. 16S rDNA and *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 1997) applied to Kimura's 2-parameter distances. Reliability of topologies was assessed by the bootstrap method with 1000 replicates. When 2 different sequences were obtained for a single strain, they were labelled a and b in the phylogenetic tree.

Quantitative DNA-DNA hybridisations. We used and compared 2 methods for DNA-DNA hybridisation experiments. Labelling of DNA probes with tritium-

labelled nucleotides was performed by the random primer method (Megaprime labelling kit) 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). A second hybridisation method was performed by a non-radioactive dot-blot method described previously (Macian et al. 2001, Le Roux et al. 2002). Statistical analyses were performed using Statgraphics software, Version 5.1. The relation between *gyrB* sequencing and DNA-DNA hybridisation (S1-nuclease method) was calculated using a reciprocal model, whereas the comparison of the 2 DNA-DNA hybridisation methods was carried out using a linear model.

RESULTS

Phenotypic characterisation

Phenotypic analysis, based on 80 biochemical tests, confirmed the relatedness of the 19 strains included in this study (70% similarity). The 19 discriminating tests were: β -galactosidase, arginine dihydrolase, tryptophan desaminase, acetoin production, oxidation/fermentation of saccharose, melibiose, amygdaline, glycerol, galactose, N-acetyl glucosamine, esculine, celibiose, amidon, gluconate, NO₂ production, growth at 4, 35 and 40°C and 6% NaCl (Table 2). The results are presented as a dendrogram using simple matching-similarity coefficients (Fig. 1).

Table 2. *Vibrio splendidus*. Phenotypic characteristics of the 19 strains examined in this study. Only results of discriminant tests are shown. 1: β -galactosidase; 2: arginine dihydrolase; 3: tryptophan desaminase; 4: acetoin production; oxidation/fermentation of 5: saccharose; 6: melibiose; 7: amygdaline; 8: glycerol; 9: galactose; 10: N-acetyl glucosamine; 11: esculine; 12: celibiose; 13: amidon; 14: gluconate; 15: NO₂ production; growth at 16: 4°C; 17: 35°C; 18: 40°C; 19: 6% NaCl

Strain designation	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
LMG 4042 ^T	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
PMV18	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
PMV19	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
A515	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
LT06	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
CIP107166 ^T	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VS6 turb	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
A053	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
VC1	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
LMG 21353 ^T	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
TNEMF6	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
TNNIII7	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
LMG 16745	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
LMG 20537 ^T	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
LMG 20539 ^T	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
LMG 20012 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
Mel 13	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Mel 107	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Mel 108	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

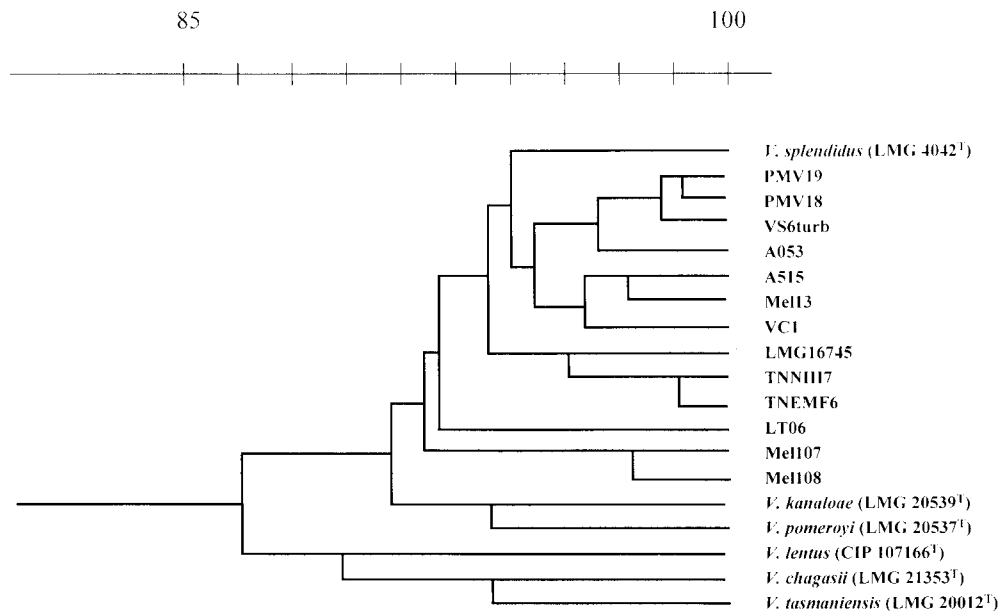


Fig. 1. *Vibrio* spp. Cluster-analysis of phenetic data using simple matching-similarity coefficient and unweighted pair-group method (percentage in top abscissa) for 18 strains related to *V. splendidus*

Phylogenetic analysis based on 16S rDNA

The 16S rDNA fragments were amplified and cloned. The sequences used for constructing the phylogenetic tree were 1332 gap-free sites in length. The 4 sequences obtained from each strain were similar, except for A053, A515 and LMG 4042^T, for which polymorphism (2% divergence) was observed. This polymorphism involved an *Hha*1 restriction site, and PCR-RFLP (restriction fragment-length polymorphism) on other clones confirmed this result (data not shown). Despite a high level of sequence similarity (98%), a cluster comprising 3 strains: TNEMF6, TNNIII7 and *Vibrio chagasii*-type Strain LMG 21353^T was supported by a bootstrap value of 96% (Fig. 2). In this phylogenetic tree the *V. lentus* type strain clustered with the *V. splendidus*-type strain, suggesting that 16S rDNA sequence-analysis does not differentiate these 2 species.

Phylogenetic analysis based on *gyrB*

The *gyrB* fragments were amplified and cloned. The sequences used in constructing the phylogenetic tree were 1064 gap-free sites long. Sequences of different cloned fragments obtained from previous strains were similar. The phylogenetic tree based on the *gyrB* nucleotide sequences from *Vibrio splendidus*-related strains confirmed clustering of LMG 21353^T, TNEMF6 and TNNIII7 (Fig. 3). Within this clade, clustering of TNEMF6, TNNIII7 and LMG 16745 was supported by

a bootstrap value of 93%. A second clade, supported by a bootstrap value of 100%, comprised 3 strains isolated from *Crassostrea gigas*: Mel 108, Mel 107 and Mel 13. A third clade, with a bootstrap value of 100%, comprised *V. splendidus*-type strain (LMG 4042^T), LT06, A515, PMV18 and PMV19. A 4th clade comprised *V. lentus*-type strain and A053, VS6turb, and VC1. *V. kanaloae*, *V. pomeroyi* and *V. tasmaniensis*-type strains were clearly separated from this 4th clade, and clustered together in a fifth clade. Similar results were obtained by 3 methods: neighbour-joining, maximum parsimony and maximum-likelihood analysis (data not shown).

Table 3. *Vibrio splendidus*. Intraspecific DNA–DNA homology among strains of 3 clades in *V. splendidus* group determined by (a) S1-nuclease method and (b) the dot-blot method

Test strain	Probe TNEMF6		Probe LMG 4042 ^T		Probe A053	
	a	b	a	b	a	b
LMG 4042 ^T	40	40	100	100	64	56
PMV18		47	75	84		70
A515		37	85	70		54
LT06		44	64	86		57
CIP107166 ^T	39		53		79	
A053		38		53	100	100
VC1		35		50	75	90
TNEMF6	100	100		40		49
TNNIII7		83	92	44	35	39
LMG 16745		63	79			

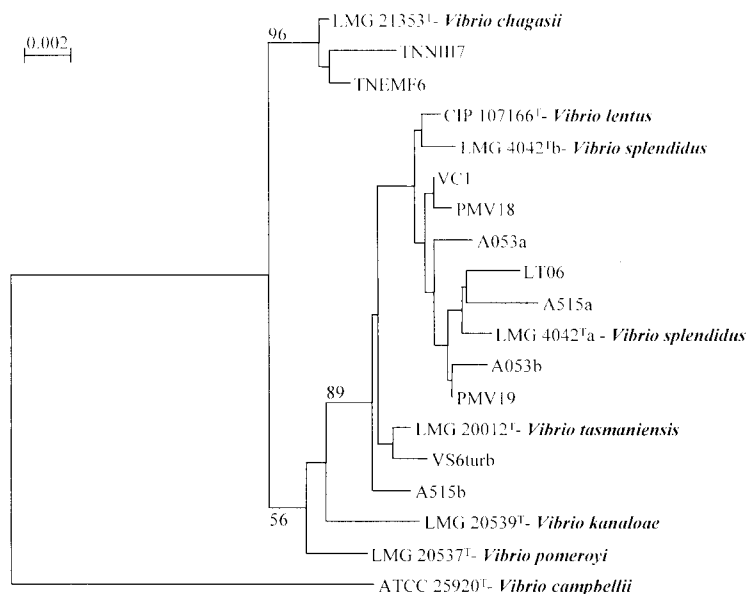


Fig. 2. *Vibrio* spp. Phylogenetic tree of partial 16S rDNA sequences. *V. campbellii* homologue was used as outgroup (EMBL accession no. X56575); 1332 gap-free sites were compared. Horizontal branch lengths are proportional to evolutionary divergence. Bootstrap values (as % of 1000 replicates) appear next to corresponding branch when >50%. In cases where 2 different sequences were obtained for a single strain, these are labelled a and b

DNA-DNA hybridisation

We used 2 methods of DNA-DNA hybridisation, S1-nuclease and dot-blot, to analyse genomic relatedness between isolates and type strains among 3 clades revealed by the phylogenetic tree in Fig. 3.

A first hybridisation was performed with strains LMG 4042^T, CIP 107166^T, TNEMF6, TNNIII7 and LMG 16745 using labelled TNEMF6 DNA as a probe. High rates of hybridisation were obtained with the dot-blot method, with percentages of re-association of 92 and 79% for TNNIII7 and LMG 16745 respectively (Table 3). Using the S1 nuclease method, the rates of hybridisation were 83 and 63% respectively. With both methods the re-association percentage was lower with LMG 4042^T and CIP 107166^T, i.e. 40 to 39% respectively.

A second set of hybridisations was performed with strains LMG 4042^T, PMV18, A515, LT06, CIP 107166^T, TNEMF6 and TNNIII7, using LMG 4042^T as a probe. Again, higher rates of hybridisation were obtained with the dot-blot method with percentages of re-association above 70% for

PMV18, A515 and LT06. Hybridisation with TNEMF6 was lower, i.e. 40%. With the S1 nuclease method, rates of hybridisation for the strains belonging to *Vibrio splendidus* ranged between 64 and 85%, and hybridisation with species from the other clade was between 44 and 53%.

A third set of hybridisations was performed with LMG 4042^T, CIP 107166^T, A053, VC1, TNEMF6 and TNNIII7, using labelled A053 DNA as a probe. The S1-nuclease method showed percentages of re-association above 75% for CIP 107166^T, A053 and VC1. Hybridisation with TNNIII7 was lower, 39%. This result was confirmed by the second method.

Comparison of methods

A reciprocal model was used to compare *gyrB* sequencing and DNA-DNA hybridisation using the S1-nuclease method (Fig. 4a). The adjusted model was: *gyrB* sequence = 109.188 – 917.844/hybridisation. The ANOVA probability value was <0.01, and adjustment between these 2 methods was statistically significant at the

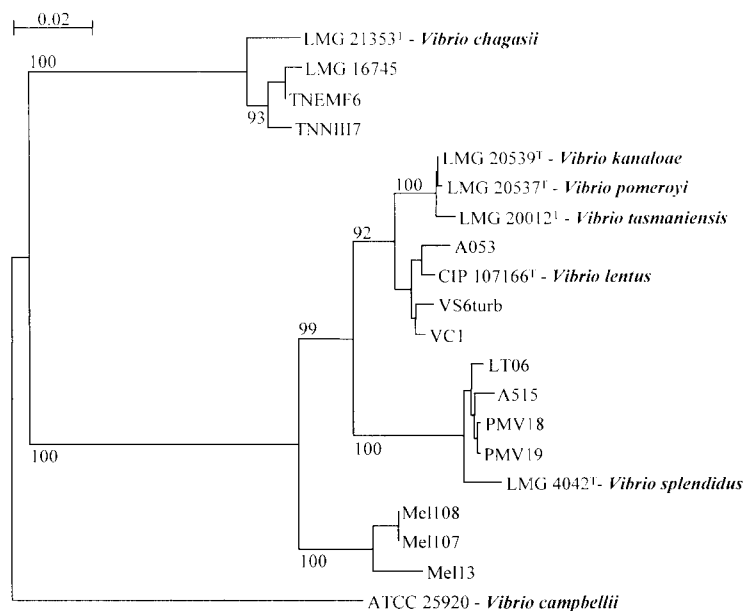


Fig. 3. *Vibrio* spp. Phylogenetic tree of partial *gyrB* sequences. *V. campbellii* homologue was used as outgroup (EMBL accession no. ABO 14950); 1064 gap-free sites were compared. Other features as in Fig. 2

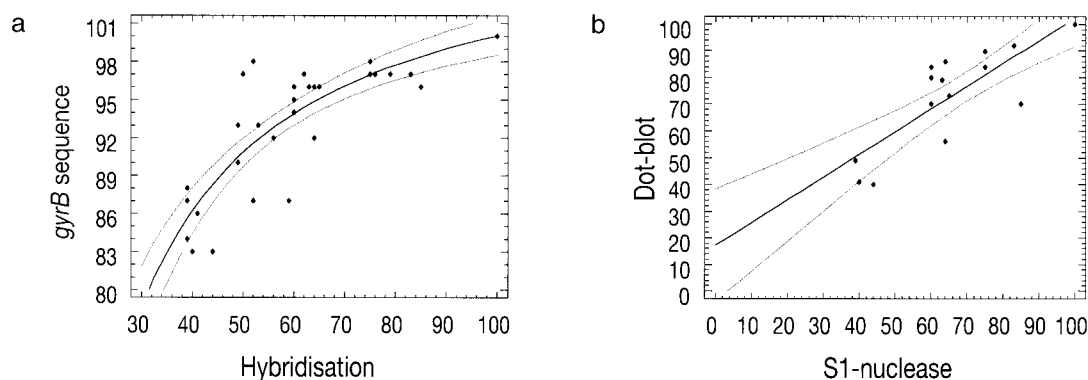


Fig. 4. Comparison of methods. (a) Reciprocal model used to compare *gyrB* sequencing and DNA–DNA hybridisation in *Vibrio splendidus* using S1-nuclease (% hybridisation in abscissa; % sequence similarities in ordinate); (b) linear model comparing S1-nuclease and dot-blot methods for determining DNA–DNA hybridisation (% hybridisation in abscissa and ordinate)

99% confidence level. The coefficient of correlation was 0.86.

A linear model was used to compare the 2 methods of DNA–DNA hybridisation (Fig. 4b). The adjusted equation was $\text{dot-blot} = 17.1881 + 0.851149 \times \text{S1-nuclease}$. The ANOVA probability value was <0.01 , and adjustment between these 2 methods was statistically significant at the 99% confidence level. The coefficient of correlation was 0.84.

DISCUSSION

Different strains related to *Vibrio splendidus* have been increasingly associated with infection of aquatic species (Sugumar et al. 1998, Gatesoupe et al. 1999, Lacoste et al. 2001, Waechter et al. 2002). As aquaculture production is highly vulnerable to the impact of infectious diseases, the prophylactic approach is of central importance. Given this, it is necessary to develop new diagnostic tests to detect specific pathogens in fishes, shellfishes and the environment, and to monitor the spread and evolution of diseases. In this context, definition and identification of bacterial species and strains raise taxonomy to its pivotal role.

Most of the *Vibrio splendidus*-related strains are generally identifiable only by means of phenotypic characterisation. This study has confirmed that the biochemical tests currently available are not sufficiently discriminatory to distinguish between strains of *V. splendidus*, *V. lentus*, *V. chagasii*, *V. pomeroiyi* and *V. kanaloae* species. Even though descriptions of new species based on biochemical tests of relatively low numbers of strains may provide a discriminatory basis, these tests prove highly variable when applied to a broader spectrum of strains belonging to this species. This could be due to metabolic versatility of strains

exposed to variations in the marine environment. Bacterial identification procedures should take this into consideration by incorporating DNA-based methods. A polyphasic approach using molecular techniques is now widely recognised and recommended for species definition (Thompson et al. 2001, Stackenbrandt et al. 2002). This should provide new identification tools for use in diagnostic laboratories.

Our preliminary phylogenetic study was based on partial 16S rDNA gene sequences. The results are in accordance with those of previous studies showing that 16S rDNA sequences of *Vibrio splendidus*-related strains are very similar (Macian et al. 2001, Le Roux et al. 2002, Waechter et al. 2002, Thompson et al. 2003a, b). They would confirm the current opinion that 16S rDNA sequences essentially permit phylogenetic analysis of distantly related strains (Gupta 1998) are probably less effective in identifying closely related strains or even species. In our study, only 1 cluster, containing the *V. chagasii*-type strain, was supported by a high bootstrap value. Sequence dimorphism was observed for several strains (Fig. 1), possibly resulting from microheterogeneity between cistrons (Fox et al. 1992), whereby divergence between cistrons is equivalent to divergence between strains. Therefore, these strains cannot be identified from our data. Bearing in mind the above limitations, the use of protein-coding genes as a data source was considered in the following analysis.

Fig. 3 shows the phylogenetic grouping based on *gyrB* sequences. The grouping is supported by strong bootstrap values and almost consistent with the results achieved with the quantitative DNA–DNA hybridisation method (Table 3). The primary indication is that strains phenotypically related to *Vibrio splendidus* can belong to distinct species, which strongly supports the suggested polyphyletic nature of *V. splendidus* and a

diversity of potentially new species related to *V. splendidus* (Macian et al. 2001, Thompson et al. 2001, 2003a,b, Le Roux et al. 2002).

Strains belonging to *Vibrio splendidus*, *V. lentus* and *V. chagasii* species were clearly separated. The delineation of TNEMF6, TNNIII7 and LMG 16745 from *V. chagasii* is suggested by a high bootstrap value in the *gyrB* phylogenetic tree. However, further studies including more strains from these 2 groups and DNA–DNA hybridisation data are necessary to test the validity of our results. Our data also suggest that Mel 108, Mel 107 and Mel 13 belong to a new taxon. Here again, further DNA–DNA hybridisation is needed, and in a further study currently in progress we hope to confirm these results and possibly determine 1 or more new species.

For *Vibrio pomereyi*, *V. kanaloae* and *V. tasmaniensis*, our *gyrB* based analysis appears less discriminative than fluorescent-amplified fragment-length polymorphism (FAFLP) fingerprintings applied to this group (Thompson et al. 2001, 2003a,b). Further work incorporating more strains belonging to these species should be conducted to compare these 2 approaches.

Quantitative DNA–DNA hybridisation is still the recognised reference method for bacterial systematics (Grimont 1984). In our study, we used and compared 2 different methods, namely S1-nuclease and dot-blot. Although the results were well-correlated, the dot-blot method frequently yielded higher rates of re-association than the S1-nuclease method (Table 3). The S1-nuclease method, using enzyme activity to digest single-stranded DNA, is probably more accurate, avoiding counts of partially hybridised probe. Hybridisation rates between 2 strains varied as a function of method (S1-nuclease/dot-blot). This raises the issue of the thresholds currently accepted for species recognition, since values may vary with method employed. For instance, the probe A053 gave a 90% hybridisation rate with VC1 using the dot-blot method, but 75% with the S1-nuclease method. Thus, in view of the fact that dot-blot results probably overestimate the homology and that the S1-nuclease method was not validated by a ΔT_m (evaluation of hybrid stability) calculation (Grimont 1984), VC1 and A053 cannot be considered to comprise a single species. However within the framework of this study, DNA–DNA hybridisations were used as tendency indicators to validate phylogenetic constructions based on *gyrB* gene sequences; e.g. PMV18 displayed 84% hybridisation with *Vibrio splendidus*-type strain compared to 70% for A053 and 47% for TNEMF6, which was in line with the phylogenetic *gyrB* analyses.

A problem associated with quantitative DNA–DNA hybridisation recently arose during sequence analyses of complete genomes. Genomic comparisons revealed

that strains belonging to the same species may contain large amounts (as many as 1.1 Megabasis out of 5) of strain-specific sequences. In the case of *Escherichia coli* strain O157 analysis surprisingly revealed a large number of prophages (Ohnishi et al. 2001). Such numerous strain-specific sequences could strongly alter the hybridisation rates between 2 strains and consequently lead to misidentification of species.

Our results support the proposal of other investigators that *gyrB*-based phylogenetic structure comprises an alternative method to DNA–DNA hybridisation for determining the taxonomic relationships of *Vibrio splendidus*-related strains (Suzuki et al. 1999, Yamamoto et al. 1999). Until the method has been rendered more effective, *gyrB* sequences could be used to cluster strains, and such clusters could then be validated by DNA–DNA hybridisation using S1-nuclease and ΔT_m calculation. Other house-keeping genes, e.g. *rpoD* (Yamamoto & Harayama 1998) and *hsp60* (Kwok et al. 2002), should also be sequenced, incorporating *gyrB* in a multilocus scheme for the future identification and classification of *Vibrio* species. Such sequence information would enable the development of molecular diagnostic tools to detect specific species or strains responsible for mortality events.

Acknowledgements. The authors acknowledge Professor J. Swing for providing LMG type strains, Professor B. Austin and Dr. F. Thompson for critically reading the manuscript, and Dr. P. Soletchnik for statistical analyses. This study was carried out with financial assistance from the European Community Reference Laboratory for Bivalve Mollusc Diseases.

LITERATURE CITED

- 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
- 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
- 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
- Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk PJ (1992) How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol* 42:166–170
- Galtier N, Gouy M, Gautier C (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: 2 graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* 12:543–548
- Garrity GM, Holt JG (2001) The road map to the manual. In: Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM (eds) *Bergey's*

- manual of systematic bacteriology, 2nd edn. Springer-Verlag, New York, p 119–166
- 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
- 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
- Gupta RS (1998) Protein phylogenies and signature sequences: a reappraisal of evolutionary relationships among Archaeobacteria, Eubacteria, and Eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1425–1491
- Kwok AY, Wilson JT, Coulthart M, Ng LK, Mutharia L, Chow AW (2002) Phylogenetic study and identification of human pathogenic *Vibrio* species based on partial *hsp60* gene sequences. *Can J Microbiol* 48:903–910
- 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 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
- Ludwig W, Klenk HP (2001) Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic frame work for prokaryotic systematics. In: Boone DR, Castenholtz RW, Garrity GM (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edn. Springer-Verlag, New York, p 49–65
- 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
- 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
- Ochman H, Wilson AC (1987) Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J Mol Evol* 26:74–86
- Ohnishi M, Kurokawa K, Hayashi T (2001) Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors? *Trends Microbiol* 9:481–485
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY
- Sneath PHA (1972) Computer taxonomy. *Methods Microbiol* 7A:29–98
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. WH Freeman, San Francisco, p 188–1308
- Stackebrandt E, Goebel BM (1994) Taxonomic note: a place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44:846–849
- 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 Microbiol* 52:1043–1047
- 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
- Suzuki M, Nakagawa Y, Harayama S, Yamamoto S (1999) Phylogenetic analysis of genus *Marinilabilia* and related bacteria based on the amino acid sequences of *gyrB* and amended description of *Marinilabilia salmonicolor* with *Marinilabilia agarovorans* as its subjective synonym. *Int J Syst Bacteriol* 49:1551–1557
- 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* 24:520–38
- 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 Microbiol* 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. *C R Acad Sci* 325:231–238
- Watanabe K, Nelson J, Harayama S, Kasai H (2001) ICB database: the *gyrB* database for identification and classification of bacteria. *Nucleic Acids Res* 29:344–145
- 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
- Yamamoto S, Harayama S (1998) Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16SrRNA genes. *Int J Syst Bacteriol* 48:813–819
- Yamamoto S, Bouvet PJ, Harayama S (1999) Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA–hybridisation. *Int J Syst Bacteriol* 49:87–95

Editorial responsibility: Carey Cunningham,
Aberdeen, UK

Submitted: July 28, 2003; Accepted: October 21, 2003
Proofs received from author(s): February 23, 2004

Article 16 : Gay & al., 2004a

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 (intrapallial or intramuscular injection) of the strains 31 and/or 32 to describe common and specific tissular alterations.

MATERIALS 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 (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 1997) 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 for 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).

Intrapallial 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

Intrapallial injection. When strains were injected in the pallial 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 pallial 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 pallial 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 the adductor muscle (Fig. 2a) or in the connective

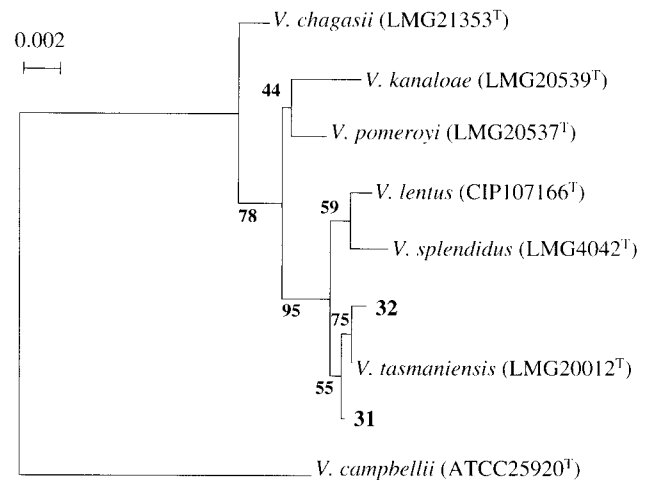


Fig. 1. Phylogenetic tree of partial 16S rDNA. The *Vibrio campbellii* homologue was used as outgroup. 1200 gap-free sites were compared. Horizontal branch lengths are proportional to evolutionary divergence. Bootstrap values (percent of 1000 replicates) appear next to the corresponding branch

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. Numbers in bold represent hybridisation rates over 70%

	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

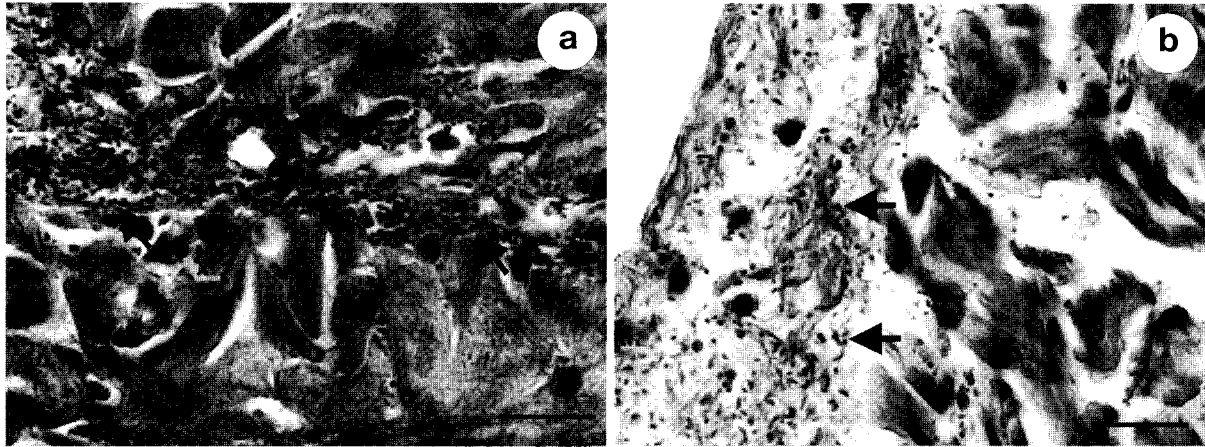


Fig. 2. *Crassostrea gigas*. Localisation of the bacteria (arrows) after experimental infection by injection in the adductor muscle. (a) Between muscular fibres at the periphery of the adductor muscle, (b) in the connective tissue surrounding the adductor muscle. HE staining, scale bars = 10 µm

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 resulting in 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

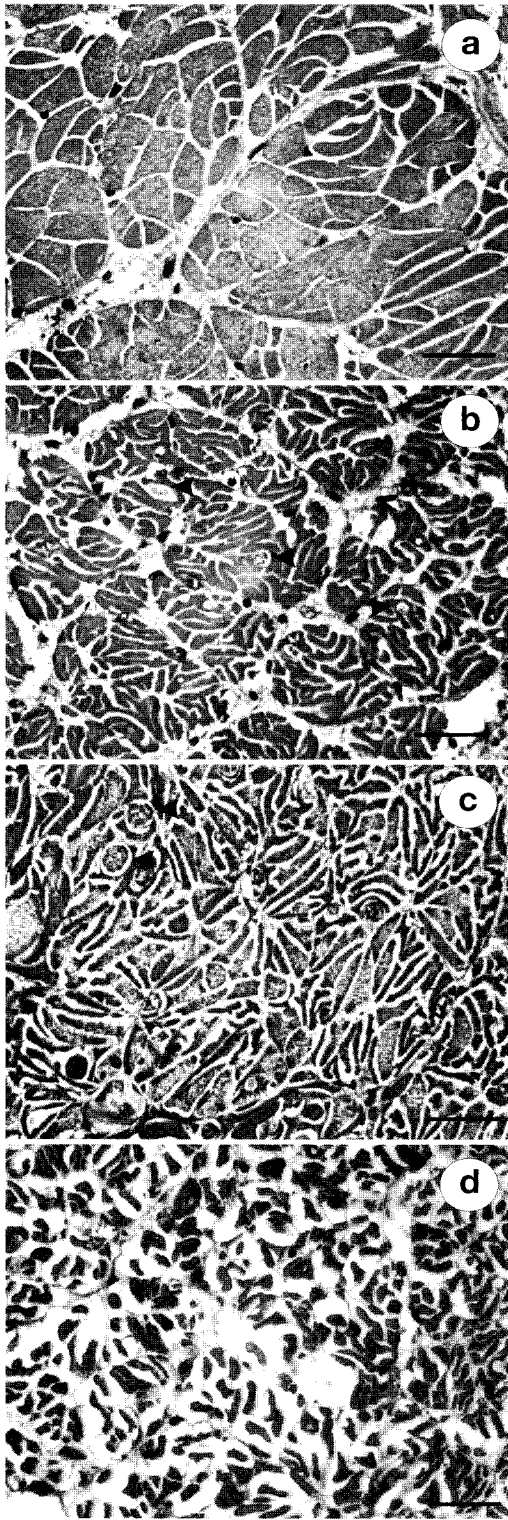


Fig. 4. *Crassostrea gigas*. Adductor muscle following the injection of (a) sterile seawater, (b–d) 31+32 into the adductor muscle. (b) Granular and non-homogenous round structures (arrowheads); (c) entire muscle bands altered with some rounded cells (arrowheads); (d) condensed muscle fibres and clear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

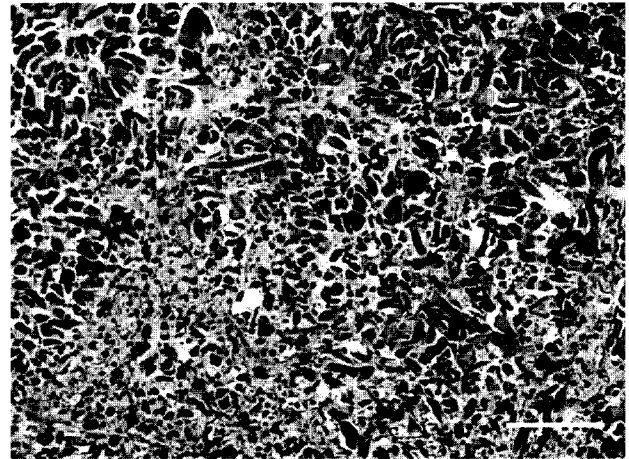


Fig. 5. *Crassostrea gigas*. Intense infiltration following injection in the adductor muscle. HE staining, scale bar = 50 μm

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.

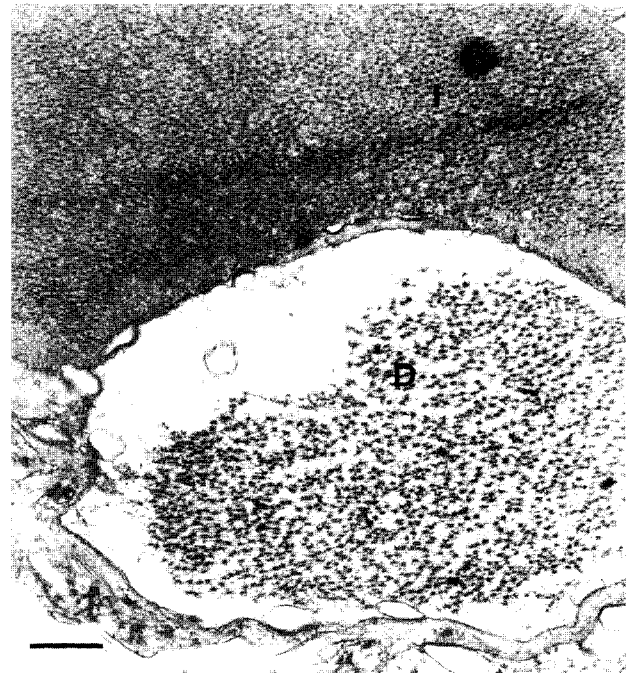


Fig. 6. *Crassostrea gigas*. Myofibril alterations following the injection of 31+32 into the adductor muscle. I: intact muscle fibres, D: degenerating muscle fibres. TEM, scale bar = 500 nm

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 nor 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 pallial 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 intrapallial 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 pallial 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; in some cases only one type of alteration was referred to (Abella et al. 2003), in others both were described and 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 as a means of fighting the infectious agent or repairing 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, it may be hypothesised that infiltration plays a final role in clearing cell debris and healing the organ rather than being due to the direct action of the pathogenic bacteria (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 pallial 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-Lacierta 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, MD, 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, Chaung 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, Frelier 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, Appelmeik 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, Giammarioli 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, Cochennec 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, Gouletquer 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

Article 17 : Gay & al., 2004b

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 µm-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	<u>15</u>
Arcachon 01-88	15	<u>8</u>
Arcachon 01-90	15	<u>14</u>
Fouras 01-92	5	<u>10</u>
Fouras 01-94	5	<u>0</u>
Fouras 01-116	8	9
Perquis J1	15	11
Perquis J8	15	15
Hatchery	15	<u>12</u>
Trinité 01-105	0	2
Trinité 01-106	6	3
Trinité 01-111	14	<u>15</u>

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

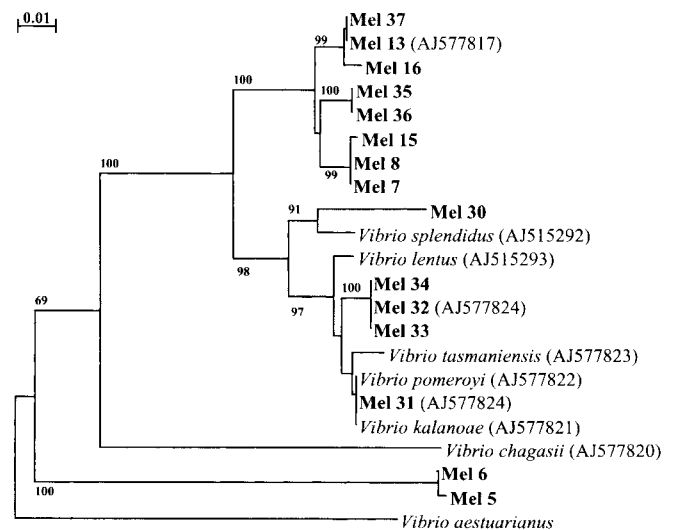


Fig. 1. Phylogenetic tree of partial *gyrB* sequences for *Vibrio splendidus* related strains and 16 strains selected by screening in experimental challenge; 588 gap-free sites were compared. The *V. aestuarianus* homologue Strain 01/32, kindly provided by J. L. Nicolas (IFREMER), was used as outgroup. 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

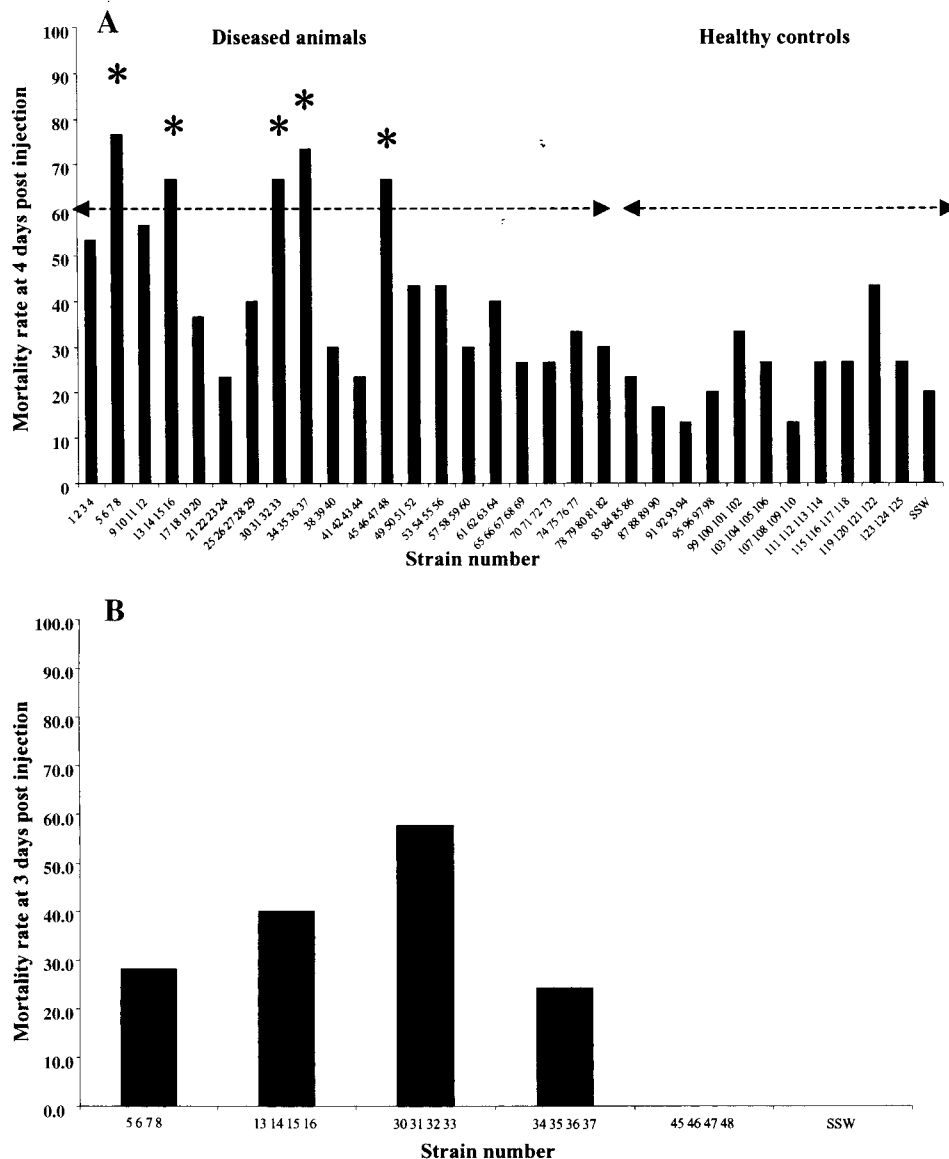


Fig. 2. (A) *Ruditapes philippinarum* and (B) *Crassostrea gigas*. Mortality rate (%) at 4 or 3 d post injection, respectively, of pooled strains to batches of (A) 30 clams or (B) 30 oysters. Strains 1 to 29, 30 to 40, 41 to 56, 57 to 69, and 70 to 82 were isolated after cohabitation experiments with 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.

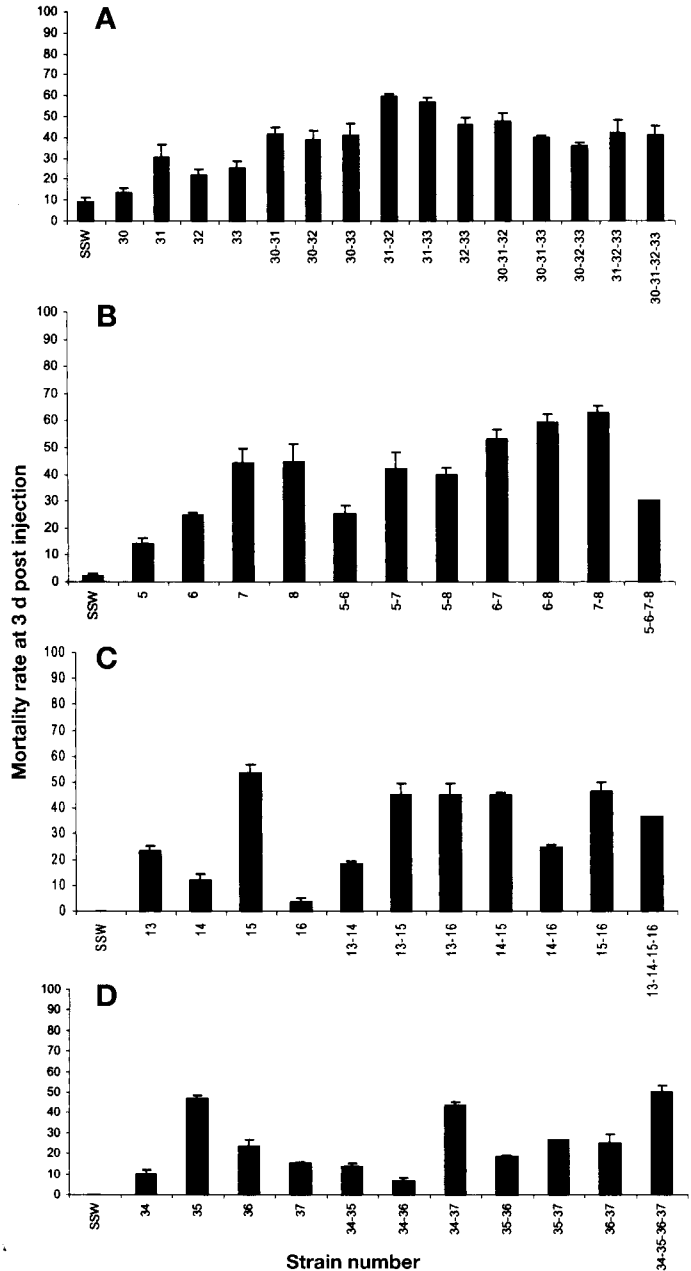


Fig. 3. *Crassostrea gigas*. Mortality rate (%) in batches of 30 oysters at 3 d post injection of strains: (A) Strains 30, 31, 32, and 33 injected individually, or in mixtures of 2, 3 and 4 strains; (B) Strains 5, 6, 7, and 8 injected individually or in mixtures of 2 and 4; (C) Strains 13, 14, 15, 16 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. penaeida*, 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, Thébault 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
- Garrigues 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, Fauray 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, Cochenne N (1994) Experimental transmission of herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Bull Eur Fish Pathol* 14:69–71
- 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

Article 18 : Faury & al., 2004

Vibrio crassostreae sp. nov., isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*)

N. Faury,¹ D. Saulnier,¹ F. L. Thompson,² M. Gay,¹ J. Swings² and F. Le Roux¹

Correspondence
F. Le Roux
fleroux@ifremer.fr

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

²Laboratory for Microbiology and BCCMTM/LMG Bacteria Collection, Laboratory for Microbiology, Ghent University, K.L. Ledeganckstraat 35, Ghent 9000, Belgium

Polyphasic analysis of five new *Vibrio* isolates originating from the haemolymph of diseased cultured oysters is described. The new isolates were closely related to *Vibrio splendidus*, having 98% 16S rRNA gene sequence similarity. *gyrB* phylogenetic analysis, fluorescent amplified-fragment length polymorphism (FAFLP) fingerprinting and DNA–DNA hybridization experiments clearly showed that the new isolates form a tight genomic group that is different from the currently known *Vibrio* species. It is proposed to accommodate these isolates in a novel species, *Vibrio crassostreae* sp. nov. (type strain LGP 7^T = LMG 22240^T = CIP 108327^T). Phenotypic and chemotaxonomic features that differentiate *V. crassostreae* from other known *Vibrio* species include arginine dihydrolase, utilization and fermentation of various carbon sources, β -galactosidase activity, NO₂ production and the presence of the fatty acids 14:0 iso and 16:0 iso.

Vibrio splendidus-related species have been associated with mortality of molluscs and fish (Nicolas *et al.*, 1996; Sugumar *et al.*, 1998; Gatesoupe *et al.*, 1999; Lacoste *et al.*, 2001; Waechter *et al.*, 2002; Farto *et al.*, 2003). Epidemiological studies of *V. splendidus* strains associated with oyster mortality outbreaks have demonstrated a high genetic diversity within this group and suggested its polyphyletic nature (Le Roux *et al.*, 2002, 2004). Six species, *Vibrio lentus*, *Vibrio kanaloae*, *Vibrio pomeroyi*, *Vibrio tasmaniensis*, *Vibrio chagasii* and *V. splendidus*, have been described within this group so far, but there exist only a limited number of diagnostic biochemical features that allow clear species discrimination within this group (Macián *et al.*, 2001; Thompson *et al.*, 2003a, b). In a previous study we investigated a collection of *V. splendidus*-related isolates originated from the haemolymph of oysters that are potentially pathogenic for the oyster *Crassostrea gigas* (Gay *et al.*, 2004). These strains were characterized by DNA gyrase subunit B (*gyrB*) gene sequencing (Le Roux

et al., 2004). Several strains clustered together but could not be assigned to any known *Vibrio* species. In the present study we present a detailed polyphasic analysis of a group of five *Vibrio* isolates, including 16S rRNA and *gyrB* gene sequencing, fluorescent amplified-fragment length polymorphism (FAFLP) fingerprinting, DNA–DNA hybridizations and biochemical tests. Collectively, the results suggest that the five isolates belong to a novel species, for which we propose the name *Vibrio crassostreae* sp. nov.

The strains used in this study were purchased from national collections (*V. splendidus* LMG 4042^T, *V. tasmaniensis* LMG 20012^T, *V. kanaloae* LMG 20539^T, *V. pomeroyi* LMG 20537^T, *Vibrio cyclitrophicus* LMG 21359^T, *V. chagasii* LMG 21353^T, *V. lentus* CIP 107166^T) or isolated from the haemolymph of cultured *C. gigas* in La Tremblade (France) [LMG 22240^T (=LGP 7^T = CIP 108327^T), LMG 22241 (=LGP 8 = CIP 108328), LMG 22248 (=LGP 15 = CIP 108329), LMG 22249 (=LGP 107 = CIP 108330), LMG 22242 (=LGP 17), LMG 22243 (=LGP 1) and LGP 108] and deposited in the BCCM/LMG Bacteria Collection (Gent, Belgium) and in the Institut Pasteur Bacteria Collection (CIP; Paris, France). All strains were cultured on tryptone soy agar (TSA; Oxoid) supplemented with 2% (w/v) NaCl for 48 h at 20 °C.

PCR amplification, cloning and sequencing of the 16S rRNA and *gyrB* gene fragments were done as described previously (Yamamoto & Harayama, 1995; Lambert *et al.*, 1998; Le Roux *et al.*, 2004). Sequences were aligned and phylogenetic analyses were performed with SEAVIEW and

Published online ahead of print on 21 May 2004 as DOI 10.1099/ijs.0.63232-0.

Abbreviation: FAFLP, fluorescent amplified-fragment length polymorphism.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the 16S rRNA and *gyrB* gene sequences of LGP 7^T are AJ582808 and AJ582799, respectively.

Tables of supplementary DNA–DNA hybridization, phenotypic and fatty acid data are available in IJSEM Online.

PHYLO_WIN software (Galtier *et al.*, 1996). Phylogenetic trees were constructed using neighbour-joining, maximum-likelihood and maximum-parsimony. For neighbour-joining analysis, distance matrices were calculated by using Kimura's 2-parameter distances (Gascuel, 1997). Reliability of topologies was assessed by the bootstrap method with 1000 replicates. FAFLP analysis was carried out as described previously (Thompson *et al.*, 2001).

For DNA–DNA hybridization experiments, *in vitro* labelling of the DNA with tritium-labelled nucleotides was performed by the random primer method (Megaprime labelling kit; Amersham) and hybridization was carried out at 60 °C by the S1-nuclease method (Crosa *et al.*, 1973; Grimont *et al.*, 1980) with adsorption of S1-resistant DNA onto Whatman DE81 filters.

Phenotypic characterization of the strains was done using the following commercially available kits: the Gram kit (bioMérieux), oxidase (Bactident oxidase; Merck), respiratory activity (meat liver medium; Diagnostic Pasteur), glucose metabolism (MEVAG; Diagnostic Pasteur), API 20E and API 50CH (bioMérieux) with the modification suggested by MacDonell *et al.* (1982), namely 2% NaCl was added to the bacterial suspension. Motility, NaCl requirement and tolerance (0, 2, 4, 6, 8 and 10%, w/v) and temperature tolerance (4, 20, 35 and 40 °C) were tested in 1.5% (w/v) peptone broth (Diagnostic Pasteur). Numerical analysis of phenotypic features was performed using simple matching coefficients (Sneath, 1972) and the unweighted pair group method (Sneath & Sokal, 1973). Sensitivity to O/129 (150 µg per disc) was determined with Oxoid discs. Fatty acid methyl ester analysis was carried out as described by Huys *et al.* (1994).

The phylogenetic tree based on the *gyrB* nucleotide sequences (1064 gap-free sites long) confirmed the clustering of *V. crassostreae* sp. nov. strains LGP 7^T, LGP 8, LGP 15, LGP 107 and LGP 108 with a bootstrap value of 100% and their distinction from their closest phylogenetic neighbours *V. cyclitrophicus*, *V. lentus*, *V. pomeroyi*, *V. kanaloae*, *V. tasmaniensis* and *V. splendidus* (Fig. 1). The phylogenetic tree based on almost-complete sequences of the 16S rRNA gene does not allow clear differentiation of the two representative isolates (LGP 7^T and LGP 8) from other species phenotypically related to *V. splendidus* (Fig. 2). Results are in accordance with previous studies, showing that the 16S rRNA gene sequences of *V. splendidus*-related strains are very similar (Macián *et al.*, 2001; Le Roux *et al.*, 2002, 2004; Thompson *et al.*, 2003a, b). Similar results were obtained by maximum-parsimony and maximum-likelihood analyses (data not shown).

The FAFLP patterns of four representative *V. crassostreae* strains consisted of 125 bands (± 9 SD). The mutual FAFLP pattern similarity among these strains was at least 86%. Strains of *V. crassostreae* sp. nov. were clearly differentiated from all the other currently known species of the *Vibrionaceae*, *V. splendidus* and *V. kanaloae* being the most closely

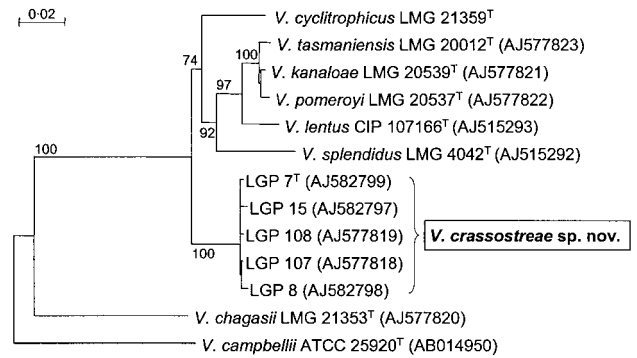


Fig. 1. Phylogenetic tree of partial *gyrB* sequences. The *Vibrio campbellii* homologue was used as the outgroup; 1064 gap-free sites were compared. Horizontal branch lengths are proportional to evolutionary divergence. Bootstrap percentages from 1000 replicates appear next to the corresponding branch.

related, with 54% similarity (Fig. 3). The FAFLP data suggest that the isolates indeed belong to a novel *Vibrio* species.

DNA–DNA hybridization experiments confirmed the grouping found with FAFLP and *gyrB*. *V. crassostreae* strains had at least 78% DNA–DNA relatedness, but at maximum 61% towards five other *V. splendidus*-related species (Supplementary Table A in IJSEM Online).

Strains of *V. crassostreae* sp. nov. could be differentiated from their closest phylogenetic neighbours by 17 phenotypic characters analysed in this study (Supplementary Table B). Those tests were coded as 1 (positive result) or 0 (negative result) and numerical analysis was performed using simple matching coefficients (Fig. 4). *V. crassostreae* sp. nov. has the main fatty acid traits of vibrios, i.e. 16:1 ω 7c and/or 15:0 iso 2-OH, 18:1 ω 7c, 12:0, 14:0, 12:0 3-OH (Supplementary Table C). The fatty acids 16:0 iso and

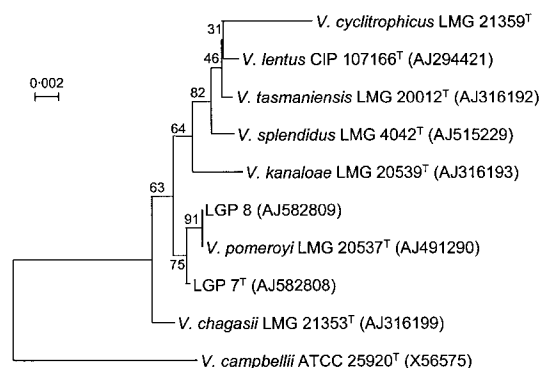


Fig. 2. Phylogenetic tree of partial 16S rRNA gene sequences; 1200 gap-free sites were compared. Other features as in Fig. 1.

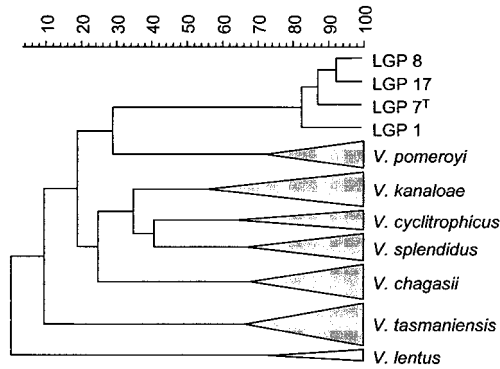


Fig. 3. Dendrogram (Dice, Ward) of the FAFLP band patterns of *V. crassostreae* sp. nov. and all other known *V. splendidus*-related species.

14:0 iso seem to be useful for discriminating among *V. splendidus*-related species.

The present study illustrates the use of the *gyrB*-based phylogenetic structure in an interim period to cluster strains before validation of species affiliation by DNA–DNA hybridization and description of phenotypic features. However, in the case of *V. pomeroyi*, *V. kanaloae* and *V. tasmaniensis*, our *gyrB*-based analysis appears to be less discriminatory than DNA–DNA hybridization or FAFLP fingerprinting (Thompson *et al.*, 2001). Sequence analyses of other loci, including *rpoD* (Yamamoto & Harayama, 1998) and *hsp60* sequences (Kwok *et al.*, 2002), are in progress in order to assess the usefulness of such genes to discriminate *V. splendidus*-related species.

Description of *Vibrio crassostreae* sp. nov.

Vibrio crassostreae (cra.sso.stre'ae. N.L. gen. n. *crassostreae* of *Crassostrea gigas*, the oyster species from which the strains were isolated).

Cells are Gram-negative, curved, 1 µm wide and 2–3 µm

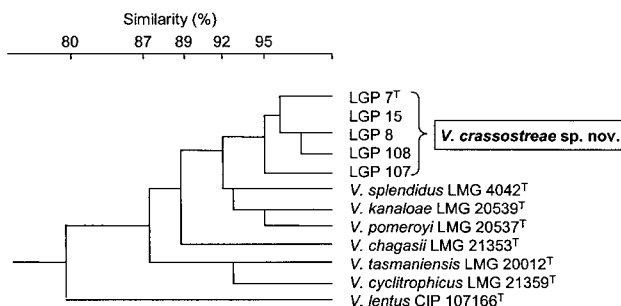


Fig. 4. Cluster analysis of phenetic data for *Vibrio* species using simple matching-similarity coefficient and unweighted pair group method (expressed as a percentage on the scale bar) for 12 strains related to *V. splendidus*.

long. Cells are motile by at least one polar flagellum. Forms translucent, non-swarming, rounded colonies with entire margins on TSA. Strains form yellow, translucent, 5 mm colonies on thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agar. Cells grow at 4 °C. None of the strains grows at 0 or 8 % NaCl. All strains are β-galactosidase-negative, arginine dihydrolase- and gelatinase-positive. Oxidase- and catalase-positive and urease-negative. Facultatively anaerobic and produces NO₂. The following compounds are utilized as sole carbon sources: glucose, sucrose, melibiose, amygdalin, glycerol, ribose, galactose, D-mannose, mannitol, N-acetylglucosamine, aesculin, cellobiose, starch, glycogen and L-fucose. None of the strains utilize inositol, rhamnose, arabinose, erythritol, D- or L-arabinose, D- or L-xylose, adonitol, methyl β-D-xyloside, L-sorbose, dulcitol, sorbitol, methyl α-D-mannoside, methyl α-D-glucoside, amygdalin, arbutin, salicin, lactose, inulin, melezitose, D-raffinose, xylitol, β-gentiobiose, D-turanose, D-lyxose, D-tagatose, D-fucose, D- or L-arabitol, 2-oxoglutarate or 5-oxoglutarate. All strains are sensitive to O/129. Major fatty acids are summed feature 3 (39.4 ± 1 %, comprising 16:1ω7c and/or 15:0 iso 2-OH), 16:0 (17.3 ± 1.3 %), 16:0 iso (8.7 ± 0.2 %), 18:1ω7c (7 ± 1.3 %), 12:0 (5.5 ± 0.3 %), 14:0 (5.4 ± 1 %), 12:0 3-OH (3.3 ± 0.2 %), summed feature 2 (2.6 ± 0.1 %, comprising 14:0 3-OH and/or 16:1 iso I and/or unidentified fatty acid with equivalent chain-length value of 10.928 and/or 12:0 ALDE), 14:0 iso (1.6 %), 17:0 (1.4 %), 17:1ω8c (1.3 %) and 14:0 iso 3-OH (1.2 %).

Type strain LGP 7^T (=LMG 22240^T=CIP 108327^T) was isolated from a diseased oyster (*Crassostrea gigas*) at the laboratoire de genetique et pathologie (Ifremer, France). Reference strains are LMG 22241 (=LGP 8=CIP 108328), LMG 22248 (=LGP 15=CIP 108329), LMG 22249 (=LGP 107=CIP 108330) and LGP 108. The GenBank/EMBL/ DDBJ accession numbers for the 16S and *gyrB* gene sequences of LGP 7^T are AJ582808 and AJ582799, respectively.

Acknowledgements

This study was carried out with financial assistance from the French Research and Technological Ministry (CRB: Collection de Ressources Biologique) and the European Community Reference Laboratory for Bivalve Mollusc Diseases. F. L. T. acknowledges a postdoctoral grant from the BCCMTM/LMG Bacteria Collection, Belgium. J. S. acknowledges grants from the Fund for Scientific Research (FWO), Belgium.

References

Crosa, J. H., Brenner, D. J. & 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.
 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*). *J Invertebr Pathol* **83**, 149–156.

- 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, F. J., Lambert, C. & Nicolas, J. L. (1999). Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *J Appl Microbiol* **87**, 757–763.
- Gay, M., Berthe, F. C. J. & Le Roux, F. (2004). Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis Aquat Organ* **59**, 49–56.
- Grimont, P. A. D., Popoff, M. Y., Grimont, F., Coynault, C. & Lemelin, M. (1980). Reproducibility and correlation study of three deoxyribonucleic acid hybridisation procedures. *Curr Microbiol* **4**, 325–330.
- Huys, G., Vancanneyt, M., Coopman, R., Janssen, P., Falsen, E., Altwegg, M. & Kersters, K. (1994). Cellular fatty acid composition as a chemotaxonomic marker for the differentiation of phenospecies and hybridization groups in the genus *Aeromonas*. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 651–658.
- Kwok, A. Y., Wilson, J. T., Coulthart, M., Ng, L. K., Mutharia, L. & Chow, A. W. (2002). Phylogenetic study and identification of human pathogenic *Vibrio* species based on partial *hsp60* gene sequences. *Can J Microbiol* **48**, 903–910.
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gélébart, F., Cordevant, C., Lange, M. & Poulet, S. A. (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 Organ* **46**, 139–145.
- Lambert, C., Nicolas, J. L., Cilia, V. & Corre, S. (1998). *Vibrio pectenica* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 481–487.
- Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B., Nicolas, J. L. & Berthe, F. C. J. (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, J. L., Gouy, M. & Berthe, F. C. J. (2004). Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences. *Dis Aquat Organ* **58**, 143–150.
- MacDonell, M. T., Singleton, F. L. & Hood, M. A. (1982). Diluent composition for use of API 20E in characterizing marine and estuarine bacteria. *Appl Environ Microbiol* **44**, 423–427.
- Macián, M. C., Ludwig, W., Aznar, R., Grimont, P. A. D., Schleifer, K. H., Garay, E. & Pujalte, M. J. (2001). *Vibrio lentus* sp. nov., isolated from Mediterranean oysters. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1449–1456.
- Nicolas, J. L., Corre, S., Gauthier, G., Robert, R. & Ansquer, D. (1996). Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis Aquat Organ* **27**, 67–76.
- Sneath, P. H. A. (1972). Computer taxonomy. *Methods Microbiol* **7**, 29–98.
- Sneath, P. H. A. & Sokal, R. R. (1973). *Numerical Taxonomy: the Principles and Practice of Numerical Classification*. San Francisco: W. H. Freeman.
- 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 Organ* **33**, 111–118.
- 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. *Syst Appl Microbiol* **24**, 520–538.
- Thompson, F. L., Thompson, C. C., 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 Microbiol* **53**, 753–759.
- Thompson, F. L., Thompson, C. C. & 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, J. L., Marissal, E. & Berthe, F. (2002). Characterization of pathogenic bacteria of the cupped oyster *Crassostrea gigas*. *C R Biol* **325**, 231–238 (in French).
- 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.
- Yamamoto, S. & Harayama, S. (1998). Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 813–819.

III.E.7- Discussion et perspectives

Jusqu'à un passé proche, les techniques diagnostiques pour les maladies des mollusques reposaient de façon quasi exclusive sur la microscopie photonique ou électronique et dans le cas plus précis des infections bactériennes, sur des isollements et une caractérisation biochimique des bactéries. Ces techniques parfois lourdes à mettre en œuvre et directement liées à l'expertise du manipulateur présentent surtout un défaut de spécificité. Face à ces contraintes, le développement de la biologie moléculaire constitue une approche nouvelle pour l'identification des agents pathogènes. Les avantages de ces techniques en sont la spécificité, la sensibilité et la rapidité. En amont de ces avantages techniques cette approche moléculaire a donné un regard nouveau sur la taxonomie, la phylogénie et donc l'évolution de ces agents infectieux.

UNE APPROCHE POLYPHASIQUE DE LA CARACTERISATION DES SOUCHES DE VIBRIONS

Le phénotypage ne permet pas d'identifier certaines espèces de vibron en raison i) du nombre important d'espèces en cours de description ; ii) de problèmes de versatilité et/ou variabilité des phénotypes qui est fréquente chez les isolats environnementaux ; iii) d'un même phénotype partagé par des souches appartenant pourtant à des espèces différentes ou au contraire de phénotypes différents chez des souches appartenant à la même espèce. Cependant, malgré le manque de pertinence des outils disponibles aujourd'hui, la description phénotypique et la mise en évidence de traits discriminants, reste un parcours obligé à la description de nouvelle espèce (Stackenbrandt et al., 2002).

Les souches de notre collection ont été typées en utilisant des kits commerciaux de mise en évidence d'activités enzymatiques (galeries API20E) et d'utilisation de composés nutritifs carbonés (galeries 50CH). Une analyse numérique de ces 80 tests a permis d'évaluer les similitudes entre phénotypes. Lors de l'identification d'une souche ou de la description d'une nouvelle espèce, les critères discriminants par rapport aux phénotypes les plus proches sont précisés. Les souches apparentées à *V. splendidus* partagent 80% du phénotype de la souche type. Ce phénotype est clairement séparé de celui d'espèces voisines comme *V. aestuarianus*.

Comme on l'a déjà précisé, le génotypage basé sur l'analyse des séquences 16S des isolats apparentés à *V. splendidus* ne permet pas de les identifier en terme d'espèce exception faite des souches appartenant à *V. chagasii*.

Comme on l'a vu également, la phylogénie basée sur les séquences du gène *gyrB* au contraire permet une bonne séparation des espèces *V. chagasii*, *V. splendidus* et *V. lentus*. Une congruence entre hybridation ADN-ADN et structuration phylogénétique est aussi obtenue dans le cas de souches appartenant à *V. tapetis* ou *V. aestuarianus*. Par contre, la phylogénie basée sur les séquences du gène *gyrB* ne permet pas de séparer les espèces *V. kanaloae*, *V. pomeroyi* et *V. tasmaniensis*, décrites par une approche AFLP et confirmée par des expériences d'hybridation ADN-ADN (Thompson et al., 2003a, b).

Les isolats 31 et 32 sont situés dans une nébuleuse contenant les souches type des espèces *V. lentus*, *V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis* (Figure 1, Gay et al., 2004a).

Ces résultats permettent donc de proposer l'utilisation du gène *gyrB* comme **un préalable** plutôt qu'une alternative à une analyse par hybridation ADN-ADN (Yamamoto et al., 1999).

Dans tous les cas la technique AFLP permet une meilleure discrimination des souches. L'identification des bactéries par ces deux approches est congruente dans la majorité des cas. Les isolats posant problème sont apparentés aux *V. splendidus*. Par exemple les souches 30, 31, 32, 33 sont décrites par AFLP comme appartenant à *V. cyclitrophicus*, espèce pourtant clairement distincte de la nébuleuse *V. lentus*, *V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis* en phylogénie.

Lors de son dernier congrès, le comité des spécialistes en systématique bactérienne s'est accordé pour définir une espèce bactérienne comme : « a category that circumscribes a genomically coherent group of isolates sharing a high degree of similarity in many independent features » (Stackenbrandt et al., 2002). Dans ce contexte, la technique d'hybridation ADN-ADN continue d'être considérée comme la référence pour définir une espèce et doit être utilisée pour valider toute approche alternative.

Considérant la bibliographie, la détermination du niveau seuil du taux d'hybridation permettant de définir des souches comme appartenant à la même espèce est controversé. Ce seuil est de 80% d'après Grimont (1984), 70% d'après Thompson (2004), et de 50-70% pour Rossello-Mora et Amann (2001). Différentes techniques sont actuellement employées selon les équipes: digestion à la S1 nucléase (Grimont et al., 1984), microplaque (Willems et al., 2001), ou dot blot (Le Roux et al., 2004). Or la variabilité du taux d'hybridation observée entre expériences et surtout entre méthodes est rapportée dans la littérature et contribue certainement à expliquer les différences des seuils d'hybridation retenus pour justifier de l'appartenance à une même espèce.

Un autre argument, lié au séquençage complet de génomes bactériens remet en cause la robustesse de cette technique (Salama et al., 2000; Ohnishi et al., 2001). Comme nous l'avons dit précédemment au sein du génome d'un isolat bactérien on peut distinguer une partie conservée et une partie variable qui peut correspondre à 22% du génome. Une telle proportion des séquences spécifiques de souches peut altérer considérablement le taux d'hybridation ADN-ADN entre deux souches appartenant à la même espèce et conduire à une mauvaise identification. Les transferts horizontaux peuvent aussi entraîner une surévaluation de la distance entre souche par AFLP.

Nous désirons maintenant nous diriger vers une approche de séquençage multilocus (MLST).

Cette approche va permettre d'aborder à la fois la notion de proximité phylogénétique (séquençage de gènes du Core) et les transferts génétiques (séquençage de gènes souche-spécifiques). Le choix des gènes d'intérêts sera basée sur l'existence de régions conservées permettant de sélectionner des séquences oligonucléotidiques dégénérées pour l'amplification de fragment en PCR, mais aussi et surtout sur la fonction du gène. Ceci permettra d'étudier la position des souches au sein d'un phylum, genre ou groupe polyphylétique. Dans le cas des vibrions cette approche peut cibler des gènes présents sur l'un ou l'autre

des chromosomes afin d'en étudier la plasticité (exemple d'un gène impliqué dans la réplication du petit chromosome, *rciB* (Egan et Waldor, 2003). On peut aussi étudier un gène codant pour des fonctions importantes à la biologie des vibrions comme la mobilité (flagelline), la colonisation (pili), la régulation de la virulence (le facteur de transcription ToxR). On peut au contraire choisir des fonctions universelles aux bactéries comme la réplication de l'ADN (*gyrB*) ou la transcription (*rpoA*, *rpoD*). La comparaison des topologies des arbres phylogénétiques obtenus permettra de mettre en évidence soit une congruence pour la séparation des souches appartenant à des clades distincts soit au contraire une répartition de type panmictique, conséquence d'une association alléatoire entre locus comme cela est observé chez *Neisseria gonorrhoeae* (Smith et al., 1993). Les conclusions quant à la plasticité des génomes et en conséquence l'évolution des bactéries pathogènes seront bien évidemment très différentes.

Perspectives : Vingt quatre souches apparentées à *V. splendidus* ont été sélectionnées pour une approche MLST. Le séquençage complet du génome de la souche 32 en cours à l'Institut Pasteur va nous permettre de choisir des gènes d'intérêts distribués sur les deux chromosomes et codant pour des fonctions distinctes. L'étude des gènes *rpoD*, *toxR* et *rciB* est en cours au LGP dans le cadre d'un CDD de 6 mois financé par le CRB (A. Goubet, mars-août 2004).

Récemment, une nouvelle notion, l'éco-type, a été proposée sur la base d'approche MLST. Un éco-type est une population clonale de souches, évoluant dans une même niche écologique et montrant une identité de séquence pour 5 à 6 gènes sur 7 analysés (Cohan, 2002). La notion d'éco-type implique que le concept d'espèce doit tenir compte de l'évolution et de l'écologie de la bactérie.

Au début de notre étude le génotypage de souches a permis de clarifier la taxonomie d'espèces phénotypiquement apparentés à *V. splendidus* avec en particulier la description entre 2001 et 2004 de 6 nouvelles espèces dont *V. crassostreae* (Macian et al. 2001 ; Thompson et al., 2003a, b; Faury et al., sous presse). L'augmentation du nombre d'isolats analysés remet en cause l'existence de certaines de ces espèces. Le cas des souches 31 et 32 illustre particulièrement bien le problème. Après des résultats controversés en AFLP et phylogénie *gyrB* ces souches ont fait l'objet d'expériences d'hybridation ADN-ADN (Gay et al., 2004b, Tableau 2). Si la proximité génomique des souches 31 et 32 est confirmée, il est toujours impossible de les identifier en tant qu'espèce puisqu'elles présentent des taux d'hybridation ADN-ADN >80% avec les souches types d'espèce *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis* et *V. kanaloae*. De mon point de vue, le groupe des *Vibrio splendidus* constituerait plutôt un continuum de souches plutôt qu'un groupe polyphylétique.

Les bactéries apparentées à *V. splendidus* ont une forte affinité pour les mollusques. Chez les huîtres on peut trouver jusqu'à 10⁵ CFU /g d'huître, contre 10² CFU /ml d'eau (Pujalte et al., 1999). D'autres auteurs décrivent 10⁵ phages/g d'huître (DePaola et al., 1998). Mon hypothèse est donc que l'huître est une niche écologique propice aux échanges génétiques entre vibrions voir entre phages et vibrions. Considérant maintenant la faible diversité génétique observée chez d'autres espèces comme *V. tapetis* ou *V. aestuarianus* (hybridation ADN-ADN > 95%), cette plasticité apparaît comme une particularité des souches apparentées à *V. splendidus*.

Ce scénario est aussi observé chez la crevette, avec une grande diversité génétique des isolats de *nigripulchritudo*, versus faible diversité entre souches appartenant à *V. penaeicida*.

Ces données m'amènent d'ores et déjà à réfléchir sur le but d'une telle stratégie évolutive pour la bactérie. Chez les vertébrés, la plasticité génomique peut conférer aux agents infectieux un avantage sélectif en leur permettant d'échapper aux cellules mémoires du système immunitaire. Chez les invertébrés, pour le moment, aucun système d'immunité spécifique n'a été mis en évidence. La plasticité du génome de bactérie pourrait par contre être à l'origine de fonction adaptative variées permettant de coloniser différentes niches écologiques (compartiments anatomiques différents de l'hôte dans l'invasion ; hôtes différents dans la transmission). Ceci m'amène à rappeler l'extraordinaire machinerie de clonage au naturel qui a été mise en évidence chez les *V. cholerae*, le super intégrom, mais aussi les relations entre phages et bactérie mis en évidence chez ce même vibrion.

Perspectives : Le séquençage complet de l'isolat 32 va nous permettre d'évaluer qualitativement et quantitativement les transferts latéraux dans ce génome. L'approche MLST permettra de mettre en évidence une éventuelle panmixie. Il serait intéressant de comparer par AFLP le devenir d'une souche de *Vibrio splendidus* (isolat 32-GFP, voir ci dessous) après plusieurs cycles d'injection et isolement successifs à des huîtres et à des poissons. Les fragments différentiels pourront être clonés, séquencés et localisés dans le génome afin de comprendre le déterminisme de cette plasticité. Mon hypothèse rejoint la notion d'écotype et pourraient faire l'objet d'une thèse dont la demande de financement sera déposée en 2005.

La question initiale de la pertinence de l'outil diagnostique reste en suspend. L'identification de souches appartenant à *V. tapetis* chez la palourde ou *V. penaeicida* chez la crevette est synonyme de pathologie. Chez les souches apparentées à *V. splendidus* (ou *V. aestuariannus*) quel que soit le niveau de regroupement (16S, *gyrB*, AFLP), chaque clade contient des souches de virulence variable. On peut se questionner sur l'intérêt de définir des espèces au niveau génomique sans considération avec la biologie de la bactérie. De mon point de vue, la notion d'espèce en bactériologie comme en parasitologie, doit prendre en compte cette biologie (virulence, niche écologique, vitesse de réplication...). Elle est le résultat phénotypique de modifications génomiques ayant une influence réelle sur le comportement de la bactérie. La classification des souches devient alors dépendante de la spécialité de celui qui identifie ; il s'agit pour le pathologiste d'identifier les souches virulentes.

LE MODELE EXPERIMENTAL DE VIBRIOSE CHEZ *C. GIGAS*, VERS LA DEFINITION D'UN « PATHOTYPE »

En raison d'un système circulatoire semi-ouvert, les huîtres ne sont pas des animaux stériles. Ainsi, l'hémolymphe peut contenir des charges importantes de bactéries sans que cela n'altère la vie de l'hôte.

Mon hypothèse initiale suppose que certains épisodes de mortalités estivales correspondent à une vibriose. Les huîtres subissant ce syndrome seraient porteuses de vibrions pathogènes alors que des huîtres saines seraient porteuses uniquement par des souches mutualistes.

Des expériences de cohabitation ont été effectuées afin de sélectionner des animaux potentiellement porteurs de souches pathogènes. Un premier criblage a été effectué en injectant les isolats regroupés par 3 ou 4 à la palourde, des travaux antérieurs ayant montré l'intérêt de ce modèle en infection expérimentale. Bien évidemment il existe un biais à ce premier criblage : il ne permet pas de sélectionner des souches spécifiquement pathogènes pour l'huître. Ainsi, suite aux travaux de l'équipe de JL Nicolas à Brest, nous avons analysé la virulence d'isolats de *V. aestuarianus* de notre collection et démontré le caractère pathogène des souches 39 et 40 chez l'huître uniquement. Ces bactéries pourront être retenues dans l'avenir pour étudier cette spécificité d'hôte dans l'apparition de mortalité.

Un second criblage chez l'huître a permis de sélectionner des souches partageant des mécanismes de pathogénicité indépendants de l'hôte qu'elles infectent (huître ou palourde). Elles sont, pour la plupart, apparentées à *V. splendidus* renforçant l'idée que ce groupe de vibrions constitue un risque réel chez les mollusques et les poissons, même si seulement un nombre restreint de souches sont pathogènes. Ces souches ont été classées selon leur virulence et deux souches induisent un taux de mortalité >50% trois jours après injection.

L'objectif initial de ce projet est atteint puisque nous disposons désormais d'au moins deux modèles expérimentaux de vibriose chez *C. gigas* (souches 15 et 35). En revanche l'hypothèse initiale selon laquelle les animaux échantillonnés sont porteurs de bactéries pathogènes est remise en cause vu le faible pourcentage de souches virulentes obtenu. Toutefois, la mise en évidence i) d'effet agoniste ou antagoniste entre souches ii) d'une grande diversité génétique des souches isolées d'huîtres avant apparition des mortalités, suggère qu'il est nécessaire de comprendre les interactions entre souches bactériennes au cours du développement de maladie.

L'effet agoniste de deux souches laisse supposer que ces bactéries, proches d'un point de vue génomique, possèdent chacune un trait de virulence spécifique que je propose d'appeler « pathotype » en référence aux écotypes définis précédemment. L'expression simultanée de deux pathotypes renforcerait la virulence des vibrions. On peut d'ores et déjà se questionner sur le nombre de pathotype que l'on doit caractériser avant de développer un outil diagnostique pertinent ! Dans un premier temps, nous avons sélectionné le modèle 31+32 pour rechercher les bases cellulaires et moléculaires de virulence commune et spécifique. Les autres souches (7+8, 39+40) feront bien sur l'objet d'études ultérieures.

La suite de ce travail a consisté à caractériser les mécanismes de virulence communs et spécifiques aux souches 31 et 32 par une approche phénotypique et génomique.

Si la capacité d'une bactérie à s'établir dans l'hôte est définie comme un trait de virulence, alors chez l'huître, bactéries pathogènes ou mutualistes possèdent certains mécanismes de virulence en commun puisqu'elles colonisent l'hôte et se retrouvent dans l'hémolymphe de l'animal. Ceci m'amène à placer en second plan l'importance des facteurs de colonisation dans la pathogénicité des vibrions chez l'huître et en premier plan les facteurs altérant l'hôte.

Une description des lésions tissulaires et des altérations cellulaires induites par l'injection de l'une et/ou l'autre des bactéries suggère que la maladie associée aux souches 31 et 32 correspond au moins en partie à une affection du muscle adducteur. L'échappement présumé des souches à la phagocytose ne reposant que sur une observation histologique, ces résultats doivent être confirmés par une autre approche expérimentale. Pour le moment aucune lésion spécifique des souches 31 ou 32 n'a été mise en évidence.

Les analyses en histopathologie sont difficiles dans notre modèle. L'utilisation d'animaux non domestiqués nécessite une analyse d'un grand nombre d'échantillons pour s'assurer de la spécificité de l'observation. L'absence de symptôme conduit à ne prélever que tardivement des échantillons moribonds au risque d'observer des lésions post-mortem. La localisation de bactéries même après coloration spécifique est difficile, la discrimination entre bactéries injectées et flore de l'hôte est impossible.

L'ensemble de ces difficultés nous ont conduit à suspendre ce travail jusqu'au développement d'outils (voir perspectives ci dessous) permettant une meilleure reproductibilité, sensibilité et spécificité des observations.

Perspectives :

1) Le développement de bactéries - GFP

Le gène codant pour la GFP va être cloné dans un vecteur suicide en aval d'un promoteur constitutif (PTRC) et en amont du gène codant pour la transposase des souches 32 ou 31. L'ensemble va être transféré au vibron par conjugaison avec une souche d'E.coli donneuse. Les bactéries 32 ou 31 ayant intégré par recombinaison simple la GFP + un gène de résistance au chloramphénicol seront sélectionnées. Après avoir confirmé que ces souches conservent leur pouvoir pathogène, ces souches fluorescentes, facilement identifiables en épifluorescence ou par un anticorps, seront un outil précieux pour l'histopathologie et la description de la pathogénèse. Cette partie constitue la première étape du travail que j'effectuerai à l'Institut Pasteur lors de mon détachement prévu en septembre 2004

2) Le développement d'un modèle animal

La variabilité des résultats obtenus en infections expérimentales peut être attribuée à la composante génétique, à l'état physiologique des animaux (age, maturation) et enfin aux conditions d'élevage. En l'absence d'un vrai modèle animal, il apparaît fondamental de réduire ces paramètres externes par l'utilisation d'animaux élevés dans des conditions standardisées en éclosérie. Le choix d'animaux triploïdes peut être défendu par le fait i) que ces animaux sont aussi sensibles aux souches

31+32 que des animaux diploïdes d'écloserie, ii) que ces animaux sont stériles et donc utilisables toute l'année contrairement aux animaux diploïdes qui sont hypersensibles aux vibrions en période de maturation, iii) que ces animaux ont une vitesse de croissance supérieure limitant le délai d'attente d'animaux exploitables. L'entretien d'un tel matériel biologique nécessitera un partenariat avec une écloserie. Cette partie fait l'objet d'une recherche d'un partenaire privé en cours. Une fois les points 1+2 résolus, la description de la localisation des bactéries ainsi que des altérations tissulaires et cellulaires de l'hôte fera l'objet d'un stage vétérinaire de 6 mois dont la demande est en cours.

3) Le développement de culture cellulaire

Les cultures cellulaires constituent le seul moyen d'aborder la physiopathologie des cellules. Les vibrions en particulier ceux apparentés à *V. splendidus*, ont été associés à des pathologies de mollusques et de poissons. Il est donc envisageable, dans un premier temps, d'utiliser un système de culture hétérologue (lignées cellulaires de poisson marin) pour caractériser les lésions cellulaires causées par les souches 31 et/ou 32.

Paradoxalement, bien que les modèles d'invertébrés marins aient permis d'obtenir des connaissances extraordinaires en biologie cellulaire (découverte du MPF et des cyclines), ils n'ont pas conduit au développement de cultures cellulaires. Aujourd'hui de nouveaux espoirs sont fondés sur i) la description de pathologies cancéreuses chez des mollusques ; ii) le développement de nouveaux milieux de culture ; iii) la construction de vecteurs d'expression chez les mollusques ; iv) l'accroissement de la connaissance des invertébrés au niveau moléculaire.

C'est dans ce contexte que Claude Delsert, cadre de recherche Ifremer détaché au CRBM de Montpellier, développe une approche intégrée pour l'obtention de lignées de cellules d'invertébrés marins, approche qui consistera en une immortalisation de cellules par expression de facteurs cellulaires ou viraux qui permettront de déclencher la transition G1/S du cycle cellulaire. Parmi les types cellulaires qui vont être mis en culture primaire puis transfectés pour obtention de lignées, il y a les cellules musculaires. Il sera alors possible de préciser les mécanismes par lesquelles les souches 31 et 32 affectent les cellules musculaires. Ce travail sera effectué dans le cadre d'un stage post-doctoral de 18 mois financé par la région Poitou Charente et dirigé par Claude Delsert.

La caractérisation de facteur de virulence par une approche de protéomique est envisageable si une fraction protéique (produit extracellulaire par exemple) présente une activité toxique. La protéine est purifiée par chromatographie ou gel acrylamide (1 ou 2D) et analysée par spectrométrie de masse et microséquençage. La séquence peptidique permettra alors de cribler le gène à l'aide d'oligonucléotides dégénérés. Cette approche nécessite l'expression *ex vivo* du gène de virulence d'intérêt.

Dans certaines conditions de culture, la souche 32 exprime une activité exotoxique plus importante que la souche 31 pour une même quantité de protéase détectée en zymographie. Ces résultats m'amènent à supposer que dans le cas de la souche 32, la toxicité des ECP n'est pas liée à l'unique expression de protéase(s). Une approche biochimique visant à caractériser la molécule responsable de cette activité pourra être engagée.

L'approche globale de séquençage de génome apparaît comme la méthode la plus informative. Le séquençage complet du génome de la souche 32 est en cours à l'Institut Pasteur. Cette espèce appartient à l'autre radiation majeure des *Vibrio*, qui compte un certain nombre de pathogènes de poissons (e.g. *V. salmonida*) et d'animaux marins, mais aussi des symbiotes, comme *V. fischeri* (dont le génome est partiellement séquencé par Integrated Genomics Inc.).

Nous entreprenons l'identification des gènes candidats pour différentes fonctions dont la pathogénie (toxine, protéase) et le quorum sensing (opéron lux) par une approche de génomique comparative avec le génome des autres bactéries pathogènes dont les vibrions.

En parallèle les bases moléculaires de la spécificité des souches sont analysées par une approche de génomique soustractive. Les premiers résultats indiquent que cette méthodologie est utile à l'identification rapide de gènes spécifiques de souches (diagnostic infra-espèce) ou à celle de gènes potentiellement liés à la virulence. En effet par cette approche un gène codant potentiellement une protéine homologue à RTX a été mise en évidence chez la souche 32.

Perspectives :

1- Développement de patho-arrays

Des puces à ADN portant des sondes correspondant aux gènes présentant un lien fonctionnel avec la virulence de vibrions pathogènes seront établies. Les technologies disponibles à l'Institut Pasteur permettent de réaliser des macro-arrays sur membranes de nylon. Nous prévoyons que ces puces porteront environ 1000 sondes déposées en double. Le patho-arrays doit être considéré comme un outil évolutif. Dans un premier temps il contiendra les gènes de virulence des vibrions entièrement séquencés (*V. cholerae*, *vulnificus*, *parahaemolyticus* et *splendidus* souche 32) puis les gènes spécifiques mis en évidence chez la souche 31, il pourra aussi contenir les gènes spécifiques des souches 7/8, 39/40 etc... Ces « pathoarrays » seront utilisés pour définir les gènes présents chez d'autres souches pathogènes d'espèce aquacole (collaboration LAC Nouvelle Calédonie, LPI et UBO Brest). Ceci devrait nous permettre dans un premier temps d'évaluer les liaisons génétiques entre gènes de virulence (« îlot de pathogénicité ») et le nombre de « pathotypes » existants. Enfin les gènes supports des pathotypes pourront être recherchés par PCR multiplex lors d'étude en épidémiologie descriptive des mortalités de coquillage ou poissons. La mise au point de patho-arrays pourra être effectuée dans le cadre d'une prolongation de 6 mois du stage post-doctoral de Mohamed Zouine (janvier-juin 2005). L'utilisation de ces macroarrays et l'identification de nouveaux pathotypes pourra faire l'objet d'une thèse dont la demande de financement sera déposée en 2006.

2- Mutagenèse

Une fois identifiés, les gènes candidats à un rôle potentiel dans la pathogénie seront inactivés en utilisant les techniques déjà utilisées pour d'autres vibrions. L'approche choisie consiste en l'utilisation d'un vecteur suicide transféré au vibron après conjugaison avec *E. coli* (Miller et al., 1988). Les mutants obtenus seront alors analysés pour leur phénotype: infection expérimentale, lésion musculaire, toxicité du surnageant, production de phéromone. Ainsi il sera possible de lier la perte d'un phénotype comme (ex : virulence) avec la perte d'un gène (ex : RTX, métalloprotéase). A partir des données génomiques nous proposerons des mécanismes d'action, orientant ainsi le développement de biotests pour le diagnostic des souches virulentes. Une approche par mutagenèse de type « signature-tagged mutagenesis » est aussi envisageable en utilisant comme base de

construction les mini-Tn5 développés par K. Timmis et coll. (1990) ou les dérivés de mariner développés par Mekalanos et coll. (2000), la fonctionnalité de ces deux systèmes ayant été démontrée chez plusieurs espèces de vibrions. Dans ce dernier cas, il est clair que la connaissance de l'intégralité du génome est un atout majeur facilitant grandement l'identification des loci inactivés. Ce travail sera effectué dans le cadre de mon détachement dans l'équipe de D. Mazel de septembre 2004 à septembre 2005.

3- Etude de la régulation de l'expression de gènes de virulence

L'expression des gènes de virulence pourra être étudiée *in vivo* (hybridation *in situ*) ou *ex vivo* (northern blot, RT PCR et macro-array) si des conditions de cultures permettant l'expression d'un phénotype d'intérêt sont mise au point. Par exemple la toxicité des ECP de la souche 32 étant dépendante du milieu de culture (forte en marine agar, faible en TCBS) il est envisageable de caractériser le transcriptome dans ces deux conditions. Il serait aussi possible d'insérer un gène reporteur (GFP, luciférase) en aval d'un promoteur régulant un opéron contenant des gènes de virulence. Une telle souche mutante pourra être utilisée pour caractériser les facteurs biotiques ou abiotiques influençant l'expression de l'opéron.

VIBRION ET MORTALITES ESTIVALES.

L'ensemble des résultats obtenus suggère que certains vibrions (*V. splendidus*, *aestuariannus*), comme le virus OHV, jouent un rôle dans le développement d'une maladie opportuniste responsable de certains épisodes de mortalité anormale de *C. gigas* en été. L'étude des maladies opportunistes est complexe car elle nécessite une approche associant pathologie et physiologie. Le dernier volet de ce travail concerne donc l'utilisation de notre modèle dans le cadre d'approches intégratives visant à mieux comprendre les modulations de l'infection en fonction des paramètres biotiques et abiotiques. Les résultats obtenus en génétique et en immunologie même s'ils sont préliminaires soulignent l'intérêt d'avoir développé un modèle de vibriose chez *C. gigas*. Vraisemblablement il sera possible de générer des familles présentant une sensibilité différente aux vibrions et d'en étudier l'héritabilité. De telles familles constitueront un modèle comparatif pour la validation de marqueurs immunologiques. Cependant la définition des « pathotypes » est un préalable au choix du mélange de vibrions à utiliser pour le testage des familles.

Les différents essais de transmission de nos souches par balnéation ou cohabitation ayant échoué, nous avons envisagé qu'un état physiologique particulier de l'huître et/ou d'un stress environnemental est nécessaire au développement de la maladie. Les expériences menées dans le cadre du projet Morest suggèrent qu'un effet sédiment et/ou maturation sexuelle des huîtres permet la transmission ou le développement des vibrioses.

Deux séries d'expériences vont être menées cette année :

1) Expériences de cohabitation huîtres injectées/non injectées :

Par des expériences de cohabitation croisées entre huîtres élevées à 15cm ou 70cm du sédiment, nous allons évaluer si "l'effet 15cm" agit au niveau donneur (virulence des vibrions et/ou receveur (sensibilité de l'huître)). L'effet de la maturation sur la transmission des vibrions sera analysé par des expériences de cohabitation avec les lots d'huîtres ayant eu un régime alimentaire différent. Ces travaux seront effectués en collaboration avec les équipes d'O. Lemoine, au laboratoire conchylicole de Poitou Charente (LCPC-Ifremer, La Tremblade) et de Stéphane Pourreau au laboratoire de physiologie des invertébrés (I.PI-Ifremer, Brest).

2) Variation temporelle des vibrions dans l'eau, le sédiment et les huîtres :

*Des huîtres ont été placées à 15 cm du sédiment à partir de Mars 2004. Un prélèvement d'huîtres ou d'eau de mer sera effectué avec un pas de temps régulier sur un an. L'eau intra-palléale et l'hémolymphe seront analysées : la population bactérienne totale/active en cytométrie ; la fraction cultivable par numération sur marine agar ; la fraction vibron après repiquage sur TCBS ; les vibrions proches de *V. splendidus* par colony blotting. Ces travaux seront menés par Laurence Miossec, cadre de recherche Ifremer au laboratoire LGP de la Tremblade*

Ces expériences nous permettront d'étudier si la proximité du sédiment entraîne un état de maturation avancée ou des pontes partielles qui pourraient modifier l'environnement intra-palléal de l'huître, lequel serait alors un milieu stimulant pour les vibrions.

III.E.8- Conclusions

L'intérêt scientifique de l'ensemble de ce projet est d'abord d'ordre fondamental, puisqu'il devrait permettre d'identifier des facteurs nouveaux impliqués dans la pathogénie des animaux marins puis de comprendre leur mode d'action. Les résultats de ce projet permettront d'appréhender les mécanismes évolutifs des génomes des vibrions (étude de la régulation et des transferts de gènes).

Les *Vibrio* apparaissent comme les bactéries les plus importantes dans les infections d'espèces aquacoles. En raison d'une caractérisation encore sommaire dans bien de cas, il reste un grand nombre de problèmes d'identification. Le développement d'outils de caractérisation basés sur la définition d'espèces mais aussi sur la virulence des souches est une étape préliminaire essentielle à une étude épidémiologique de l'impact de ces bactéries sur les élevages ou à toute démarche prophylactique. Ceci nécessitera une étroite collaboration entre mon équipe de recherche et le réseau national de surveillance en pathologie des mollusques (REPAMO) en charge des questions d'épidémiosurveillance.

Les approches et connaissances développées sur le modèle *V. splendidus* pourront être profitable à l'étude des autres souches pathogènes d'espèces d'intérêts aquacoles en particulier *V. aestuarianus* (collaboration J.L. Nicolas, Ifremer Brest ; Thèse de Yannick Labreuche en cours), *V. nigripulchritudo* (collaboration C. Goarant, Ifremer Nouvelles Calédonie ; Thèse démarant en décembre 2004) et *V. tapetis* (C. Paillard, UBO Brest).

Outre l'intérêt de ce travail en matière de diagnostic et d'épidémiologie, le développement d'un modèle expérimental d'interaction pathogène/huître permettra d'étudier l'effet de facteurs biotiques ou abiotiques dans l'expression de la maladie (collaborations V. Boulot Ifremer Montpellier ; Stephane Pouvreau Ifremer Brest ; Pierre Boudry Ifremer La Tremblade). Dans ce contexte, le choix du vibron est renforcé par la possibilité de culture de ce micro-organisme (contrairement aux virus et protozoaires infectant ces animaux) et aussi la possibilité presque unique de réaliser le séquençage complet du génome d'une des souches d'intérêt (collaboration Institut Pasteur Paris). Ce travail débouchera sur une phase de mutagenèse dirigée qui permettra de caractériser la fonction des gènes impliqués dans la virulence des vibrions. Les problèmes liés à l'absence d'un « animal modèle » pourront être réduits par l'utilisation d'animaux élevés en éclosion (recherche d'un partenaire privé en cours) mais aussi et surtout par le développement de système *ex vivo* de culture cellulaire (collaboration Claude Delsert, CRBM, Montpellier). Car s'il est aujourd'hui possible de connaître l'intégralité du génome d'une souche de vibron pathogène de *C. gigas*, ce travail n'a de sens pour un pathologiste que si les outils et compétences permettant l'étude phénotypique des mécanismes de virulence sont développés en parallèle. Ceci requiert des modèles de laboratoire tant animaux que cellulaires.

L'approche fondamentale utilise des modèles éloignés des préoccupations immédiates de l'aquaculture. Le développement par un laboratoire thématique Ifremer d'un modèle standardisé d'interaction hôte-pathogène sur une espèce aquacole permettra de mieux comprendre les mécanismes physiologiques conduisant à une meilleure survie des animaux et permettra par conséquent d'élaborer des plans de lutte mieux adaptés vis à vis des maladies d'élevages.

III.F- Références bibliographiques

- Actis LA, Fish W, Crosa JH, Kellerman K, Ellenberger SR, Hauser FM, Sanders-Loehr J. (1986) Characterization of anguibactin, a novel siderophore from *Vibrio anguillarum* 775(pJM1). *J Bacteriol.* 167(1):57-65.
- Actis LA, Tolmasky ME, Farrell DH, Crosa JH. (1988) Genetic and molecular characterization of essential components of the *Vibrio anguillarum* plasmid-mediated iron-transport system. *J Biol Chem.* 263 (6):2853-60.
- Allam, B., C. Paillard and M. Auffret. 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.
- Allam, B., C. Paillard, A. Howard and M. Le Pennec. 2000. Isolation of the pathogen *Vibrio tapetis* and defense parameters in brown ring diseased Manila clams *Ruditapes philippinarum* cultivated in England. *Dis Aquat. Org.*, 41:105-113.
- Alsina, M., Blanch, A. R., 1994. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J. Appl. Bact.* 76, 79-85.
- Bassler, B. L. (2002). Small talk : cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* 109, 421-424.
- Baumann P, Baumann L, Bang SS, Woolkalis MJ (1980) Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckea*, and *Photobacterium*: abolition of the genus *Beneckea*. *Curr Microbiol* 4:127-132
- Berthe F., 2002. Thèse de doctorat de l'Université de Clermont Ferrand.
- Belvin MP, Anderson KV. (1996) A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol.*;12:393-416.
- Betley MJ, Miller VL, Mekalanos JJ. (1986) Genetics of bacterial enterotoxins. *Annu Rev Microbiol.* 40:577-605
- Biskri Latéfa, 2003, thèse de doctorat de l'Université Paris VII, France
- Booth BA, Boesman-Finkelstein M, Finkelstein RA. (1984) *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease nicks cholera enterotoxin. *Infect Immun.* 45(3):558-60.
- 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. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46: 480-484.
- Le Marrec-Croq F, Glaise D, Guguen-Guillouzo C, Chesne C, Guillouzo A, Boulo V, Dorange G. (1999) Primary cultures of heart cells from the scallop *Pecten maximus* (mollusca-bivalvia). *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 35(5):289-95.
- Brown, C. and E. Losee. 1978. Observations on natural and induced epizootics of vibriosis in *Crassostrea virginica* larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 31: 41-47.
- Cadoret JP, Debon R, Cornudella L, Lardans V, Morvan A, Roch P, Boulo V. (1999) Transient expression assays with the proximal promoter of a newly characterized actin gene from the oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Lett.* 22;460(1):81-5.

- Chiang, S. L., and J. J. Mekalanos. 2000. Construction of a *Vibrio cholerae* vaccine candidate using transposon delivery and FLP recombinase-mediated excision. *Infect Immun.* 68(11):6391-7.
- Chuang YC, Chang TM, Chang MC. (1997) Cloning and characterization of the gene (empV) encoding extracellular metalloprotease from *Vibrio vulnificus*. *Gene.* 189(2):163-8.
- Champion GA, Neely MN, Brennan MA, DiRita VJ. (1997) A branch in the ToxR regulatory cascade of *Vibrio cholerae* revealed by characterization of toxT mutant strains. *Mol Microbiol.* 23(2):323-31
- Crosa JH. (1980) A plasmid associated with virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* specifies an iron-sequestering system. *Nature.* 284:566-8.
- Crowther RS, Roomi NW, Fahim RE, Forstner JF. (1987) *Vibrio cholerae* metalloproteinase degrades intestinal mucin and facilitates enterotoxin-induced secretion from rat intestine. *Biochim Biophys Acta.* 924(3):393-402.
- Davis BM, Waldor MK. (2003) Filamentous phages linked to virulence of *Vibrio cholerae*. *Curr Opin Microbiol.* 6(1):35-42.
- Davis BM, Kimsey HH, Kane AV, Waldor MK. (2002) A satellite phage-encoded antirepressor induces repressor aggregation and cholera toxin gene transfer. *EMBO J.* 21(16):4240-9.
- DeLoney-Marino CR, Wolfe AJ, Visick KL. (2003) Chemoattraction of *Vibrio fischeri* to serine, nucleosides, and N-acetylneuraminic acid, a component of squid light-orga mucus. *Appl Environ Microbiol.* 69(12):7527-30.
- Denkin SM, Nelson DR. (1999) Induction of protease activity in *Vibrio anguillarum* by gastrointestinal mucus. *Appl Environ Microbiol.* 65(8):3555-60.
- DePaola A, Motes ML, Chan AM, Suttle CA. (1998) Phages infecting *Vibrio vulnificus* are abundant and diverse in oysters (*Crassostrea virginica*) collected from the Gulf of Mexico. *Appl Environ Microbiol.* 64(1):346-51
- DiRita VJ. (1992) Co-ordinate expression of virulence genes by ToxR in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol.* 6(4):451-8.
- Disalvo, L.H., J. Blecka and R. Zebal. 1978. *Vibrio anguillarum* and larval mortality in a California coastal shellfish hatchery. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35: 219-221.
- Egan ES, Waldor MK. (2003) Distinct replication requirements for the two *Vibrio cholerae* chromosomes. *Cell.* 114(4):521-30.
- Elston, R. and L. Leibovitz. 1980. Detection of vibriosis in hatchery reared larval oysters: correlation between clinical, histological and ultrastructural observations in experimentally induced disease. *Proc. Nat. Shellfish. Ass.*, 70: 122-123.
- Elston, R. and L. Leibovitz. 1980. Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oysters, *Crassostrea virginica*. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 37: 964-978.
- Escoubas JM, Briant L, Montagnani C, Hez S, Devaux C, Roch P. (1999) Oyster IKK-like protein shares structural and functional properties with its mammalian homologues. *FEBS Lett.* 453(3):293-8.
- Escoubas Jean Michel (2004) Habilitation à diriger la recherche. Université de Montpellier.

- 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, Perez MJ, Fernandez-Briera A, Nieto TP. (2002) Purification and partial characterisation of a fish lethal extracellular protease from *Vibrio pelagius*. *Vet Microbiol.* 89(2-3):181-94.
- 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* 83:149-56.
- Foster JS, Apicella MA, McFall-Ngai MJ. (2000) *Vibrio fischeri* lipopolysaccharide induces developmental apoptosis, but not complete morphogenesis, of the *Euprymna scolopes* symbiotic light organ. *Dev Biol.* 226(2):242-54.
- Fullner KJ, Mekalanos JJ. (1999) Genetic characterization of a new type IV-A pilus gene cluster found in both classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun.* 67(3):1393-404
- Fullner KJ, Mekalanos JJ. (2000) In vivo covalent cross-linking of cellular actin by the *Vibrio cholerae* RTX toxin. *EMBO J.* 19(20):5315-23
- Fuqua, C. & Greenberg, E. P. (1998). Self perception in bacteria : quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Current opinion in microbiology* 1, 183-189.
- Gatesoupe FJ, Lambert C, Nicolas JL (1999) Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *J Appl Microbiol* 87:757-763
- Goarant C, Mérien F, Berthe F, Mermoud I, Pérolat P (1999) Arbitrarily primed PCR to type *Vibrio* spp. pathogenic for shrimp. *Applied and Environmental Microbiology* 65:1145-1151
- Goarant et al., 1999 ; Goarant et al., 2000
- Goarant C, Herlin J, Brizard R, Marteau AL, Martin C, Martin B (2000) Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 40:101-107
- Gouletquer P, Soletchnik P, Le Moine O, Razet D, Geairon P, Fauray N, Taillade S. (1998) Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes Oléron (France). *ICES Mariculture Committee CM 1998/CC* p 14-21
- Graf J, Dunlap PV, Ruby EG. (1994) Effect of transposon-induced motility mutations on colonization of the host light organ by *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol.* 176(22):6986-91.
- Grimont PAD (1984) Use of DNA reassociation in bacterial classification. *Can J Microbiol* 34:541-546
- Hada, H.S., P.A. West, J.V. Lee, J. Stemmler and R.R. Colwell. 1984. *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve molluscs. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34: 1-4.
- Harvell, et al. (1999). Emerging Marine Diseases--Climate Links and Anthropogenic Factors . *Science* September 3; 285: 1505-1510.
- Hase CC, Finkelstein RA. (1991) Cloning and nucleotide sequence of the *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease (HA/protease) gene and construction of an HA/protease-negative strain. *J Bacteriol.* 173(11):3311-7
- Heidelberg et al., 2000 DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature.* 2000 Aug 3;406(6795):477-83.

- Herrero, M., V. de Lorenzo, and K. N. Timmis. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*. 172(11):6557-67.
- Honda T, Ni Y, Miwatani T, Adachi T, Kim J. (1992) The thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* is a pore-forming toxin. *Can J Microbiol*. 38(11):1175-80.
- Jeffries, V.E. 1982. Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, 29: 201-226.
- Jurica MS, Stoddard BL. (1998) Mind your B's and R's: bacterial chemotaxis, signal transduction and protein recognition. *Structure*. 6:809-13.
- Kaprelyants, A. S., Kell, D. B. (1996). Do bacteria need to communicate with each other for growth? *Trends in microbiology* 4, 237-242.
- Kawagishi I, Nakada M, Nishioka N, Homma M. (1997) Cloning of a *Vibrio alginolyticus* rpoN gene that is required for polar flagellar formation. *J Bacteriol*. 179(21):6851-4.
- Krukonis ES, DiRita VJ 2003. From motility to virulence: Sensing and responding to environmental signals in *Vibrio cholerae*. *Curr Opin Microbiol*. 6(2):186-90.
- Kwok AY, Wilson JT, Coulthart M, Ng LK, Mutharia L, Chow AW (2002) Phylogenetic study and identification of human pathogenic *Vibrio* species based on partial *hsp60* gene sequences. *Can J Microbiol* 48:903-910
- 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., J.L. Nicolas, V. Cilia and S. Corre. 1998. *Vibrio pectenocida* sp. nov. a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 481-487.
- 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 Ass fish Pathol* 19:102-106
- Lee SE, Shin SH, Kim SY, Kim YR, Shin DH, Chung SS, Lee ZH, Lee JY, Jeong KC, Choi SH, Rhee JH. (2000) *Vibrio vulnificus* has the transmembrane transcription activator ToxRS stimulating the expression of the hemolysin gene *vvhA*. *J Bacteriol* 182(12):3405-15.
- 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 Liv Res* 15:251-258
- Lin Z, Kumagai K, Baba K, Mekalanos JJ, Nishibuchi M. (1993) *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae* *toxRS* operon that mediates environmentally induced regulation the thermostable direct hemolysin gene. *J Bacteriol* 175(12):3844-55.
- Lin W, Fullner KJ, Clayton R, Sexton JA, Rogers MB, Calia KE, Calderwood SB, Fraser C, Mekalanos JJ. (1999) Identification of a *vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96 (3):1071-6.

- 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
- Makino et al., 2003 Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet*. 2003 Mar 1;361(9359):743-9.
- Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. (1998) A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science*. 280(5363):605-8.
- McGee K, Horstedt P, Milton DL. (1996) Identification and characterization of additional flagellin genes from *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol*. 178(17):5188-98.
- Mekalanos JJ. (1983) Duplication and amplification of toxin genes in *Vibrio cholerae*. *Cell*. 35(1):253-63
- Mekalanos JJ. (1992) Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol*. 174 (1):1-7.
- Miller VL, Mekalanos JJ. (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J Bacteriol*. 170(6):2575-83.
- Miller VL, Taylor RK, Mekalanos JJ. (1987) Cholera toxin transcriptional activator *toxR* is a transmembrane DNA binding protein. *Cell*. 48(2):271-9.
- Milton DL, Norqvist A, Wolf-Watz H. (1992) Cloning of a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol*. 174(22):7235-44.
- Milton DL, O'Toole R, Horstedt P, Wolf-Watz H (1996) Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol*. 178(5):1310-9.
- Miyoshi S, Nakazawa H, Kawata K, Tomochika K, Tobe K, Shinoda S. (1998) Characterization of the hemorrhagic reaction caused by *Vibrio vulnificus* metalloprotease, a member of the thermolysin family. *Infect Immun*. 66(10):4851-5.
- Montagnani C, Kappler C, Reichhart JM, Escoubas JM. (2004) Cg-Rel, the first Rel/NF-kappaB homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Lett*. 561(1-3):75-82
- Nesper J, Lauriano CM, Klose KE, Kapfhammer D, Kraiss A, Reidl J. (2001) Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El tor *galU* and *galE* mutants: influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. *Infect Immun*. 69(1):435-45.
- 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
- Norimatsu M, Ono T, Aoki A, Ohishi K, Takahashi T, Watanabe G, Taya K, Sasamoto S, Tamura Y. (1995) Lipopolysaccharide-induced apoptosis in swine lymphocytes in vivo. *Infect Immun* 63(3):1122-6.
- Ohnishi M, Kurokawa K, Hayashi T (2001) Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors? *Trends Microbiol* 9:481-485

- Okuda J, Nakai T, Chang PS, Oh T, Nishino T, Koitabashi T, Nishibuchi M. (2001) The *toxR* gene of *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum* controls expression of the major outer membrane proteins but not virulence in a natural host model. *Infect Immun.* 69(10):6091-101.
- 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
- O'Toole R, Milton DL, Wolf-Watz H. (1996) Chemotactic motility is required for invasion of the host by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Mol Microbiol.* 19(3):625-37
- Osek J, Svennerholm AM, Holmgren J. (1992) Protection against *Vibrio cholerae* El Tor infection by specific antibodies against mannose-binding hemagglutinin pili. *Infect Immun.* 60(11):4961-4.
- Paillard, C. and P. Maes. 1990. Etiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum*. pathogénicité d'un *Vibrio* sp. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 310: 15-20.
- Pearson GD, Woods A, Chiang SL, Mekalanos JJ. (1993) CTX genetic element encodes a site-specific recombination system and an intestinal colonization factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*90(8):3750-4.
- Pedersen, K., L. Verdonck, B. Austin, D.A. Austin, A.R. Blanch, P.A.D. Grimont, J. Jofre, S. Koblavi, J.L. Larsen, T. Tiainen, M. Vigneulle and J. Swings. 1998. Taxonomic evidence that *Vibrio carchariae* (Grimes *et al.* 1984b) is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Baumann *et al.* 1980). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 749-758.
- Pujalte MJ, Ortigosa M, Macian MC, Garay E. (1999) Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater. *Int Microbiol* 2(4):259-66.
- Renault, T., Le Deuff, R. M., Cochennec, N., Chollet, B., Maffart, P., 1995. Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of pacific oysters, *Crassostrea-gigas* a comparative-study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Vet. Res.* 26, 539-543.
- Rossello-Mora R, Amann R. (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* 25(1):39-67.
- Rowe-Magnus DA, Mazel D. (2001) Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. *Curr Opin Microbiol.* 4(5):565-9.
- Ruby EG. (1996) Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organ symbiosis. *Annu Rev Microbiol.*;50:591-624.
- Salama NR, Falkow S. (1999) Genomic clues for defining bacterial pathogenicity. *Microbes Infect.* 1(8):615-9.
- Salyers AA et Whitt DD (1994) *Bacterial pathogenesis, a molecular approach.* ASM Press. Washington, DC.
- Simpson LM, White VK, Zane SF, Oliver JD. (1987) Correlation between virulence and colony morphology in *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun.* 55(1):269-72.
- Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. (1993) How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(10):4384-8.

- Soletchnik P, Razet D, Geairon P, Faury N, Gouletquer 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
- Sperandio V, Giron JA, Silveira WD, Kaper JB. (1995) The OmpU outer membrane protein, a potential adherence factor of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun.* 63(11):4433-8.
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PAD, 9 others (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1043-1047
- Struhl K. (1999) Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell.* 98(1):1-4.
- 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. *Dis Aquat. Org.*, 19: 111-118.
- Tacket CO, Taylor RK, Losonsky G, Lim Y, Nataro JP, Kaper JB, Levine MM. (1998) Investigation of the roles of toxin-coregulated pili and mannose-sensitive hemagglutinin pili in the pathogenesis of *Vibrio cholerae* O139 infection. *Infect Immun.* 66(2):692-5.
- Taylor RK, Miller VL, Furlong DB, Mekalanos JJ. (1987) Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(9):2833-7.
- Thompson, 2003. Thèse de doctorat de l'Université de Gand, Belgique.
- Tubiash, H.S., P.E. Chanley and E. Leifson. 1965. Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *J. Bacteriol.*, 90: 1036-1044.
- Turlan Catherine, 1996, thèse de doctorat de l'Université Paul Sabatier, Toulouse, France
- Waechter M, Le Roux F, Nicolas JL, Marissal E, Berthe F (2002) Characterisation of *Crassostrea gigas* spat pathogenic bacteria. *CR Biologies* 325:231-238
- Waldor MK, Colwell R, Mekalanos JJ. (1994) The *Vibrio cholerae* O139 serogroup antigen includes an O-antigen capsule and lipopolysaccharide virulence determinants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(24):11388-92.
- Willems A, Doignon-Bourcier F, Goris J, Coopman R, de Lajudie P, De Vos P, Gillis M. (2001) DNA-DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51 : 1315-22.
- Wirth, R., Muscholl, A. & Wanner, G. (1996). The role of pheromones in bacterial interactions. *Trends in microbiology* 4, 96-102.
- Yamaichi Y, Iida T, Park KS, Yamamoto K, Honda T. (1999) Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*: presence of two chromosomes in *Vibrio* species. *Mol Microbiol.* Mar; 31(5):1513-21.

- 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
- Yamamoto S, Harayama S (1998) Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16SrRNA genes. *Int J Syst Bacteriol* 48:813-819
- Yamamoto S, Bouvet PJ, Harayama S (1999) Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA--DNA hybridisation. *Int J Syst Bacteriol* 49:87-95
- Yoshida S, Ogawa M, Mizuguchi Y. (1985) Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun.* 47(2):446-51.
- Yorimitsu T, Homma M. (2001) Na(+)-driven flagellar motor of *Vibrio*. *Biochim Biophys Acta.* 1505(1):82-93.

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