

Université de Paris 6 – Pierre et Marie Curie  
4 Place Jussieu  
75005 Paris

IFREMER  
Laboratoire de Génétique et de Pathologie  
Avenue de Mus du Loup  
17390 La Tremblade

Thèse de Doctorat de l'Université Paris 6 – Pierre et Marie Curie

Ecole Doctorale B2M – Biochimie et Biologie Moléculaire

Spécialité Microbiologie

Présentée par YANN REYNAUD

Pour obtenir le titre de Docteur de l'Université Paris 6

Sujet de la thèse

**Identification de marqueurs génétiques de la virulence  
chez *Vibrio nigripulchritudo*, un pathogène de crevettes  
pénéides en Nouvelle-Calédonie**

Soutenue le 8 avril 2008

Composition du jury :

Dr Annick JACQ  
Pr Colin TINSLEY  
Dr Frédérique LE ROUX  
Pr André KLIER  
Pr Philippe LEBARON  
Dr Evelyne BACHERE  
Dr Mohamed ZOUINE

Rapporteur  
Rapporteur  
Directeur de thèse  
Co-directeur de thèse  
Professeur, Université Paris 6  
Examineur  
Examineur



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements à l'IFREMER, au gouvernement de Nouvelle-Calédonie et à l'Institut de Génomique Marine, à l'origine du financement de cette thèse, ainsi qu'à toutes les personnes qui de près ou de loin ont participé à la réalisation de ce travail.

J'adresse également mes remerciements à Philippe Gouletquer ainsi qu'à Jean Prou pour m'avoir accueilli à la station IFREMER de La Tremblade, à Tristan Renault pour m'avoir accueilli dans son équipe et à Yves Harache pour m'avoir accueilli à la station IFREMER de St Vincent en Nouvelle-Calédonie.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au Professeur Philippe Lebaron pour avoir accepté de présider ce jury de thèse. J'adresse également mes remerciements au Docteur Annick Jacq et au Professeur Colin Tinsley pour avoir accepté d'en être les rapporteurs et aux examinateurs, le Docteur Evelyne Bachère et le Docteur Mohamed Zouine pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Un très grand merci, un merci très spécial à mes trois encadrants scientifiques qui sont à l'origine de ce travail de thèse et qui m'ont vraiment accompagnés au long de ces trois années : ma directrice de thèse Frédérique Le Roux, Denis Saulnier et Cyrille Goarant, chacun dans un lieu différent (Paris, La Tremblade, la Nouvelle-Calédonie), toujours dans une ambiance très amicale et particulièrement enrichissante à mes yeux. Merci pour votre patience, merci pour votre pédagogie, pour toutes les discussions de science ou de vie, merci pour nos échanges !

J'exprime également toute ma gratitude au Professeur André Klier de l'Université de Paris 6 pour avoir accepté de co-encadrer cette thèse.

Merci à l'ensemble de l'équipe pathologie et de la station de La Tremblade, et tout particulièrement un grand merci à Nicole pour la bonne ambiance (je garde un souvenir ému de cet épisode avec le congélateur à -80°C...); à Florence pour toutes les publis dénichées (j'ai toujours pas vu la photo de Serge Betsen !!! comme convenu tu me dois un café par jour de retard, soit au moment où j'écris ces remerciements, 17 cafés !!! court et non sucré stp...); à Véro pour son efficacité, sa joie de vivre; à Denis et Carotte pour les petites soirées tranquilles à décortiquer des lapins; et tous les autres aussi : Isa, Cyrille, Laurence, Florence, Jean-Pierre, JF, Bruno, Céline, Tristan, Philippe, Maeva, Sylvie, Maryse, Christopher, Cyrielle, Mathilde; et merci aux habitants de ce monde lointain, le pays derrière la passerelle.

Merci à tous les collègues et amis rencontrés en Nouvelle-Calédonie, côtoyés par trois fois : les noms commencent à se faire flous, je crois qu'il faudrait que je revienne pour me rafraîchir la mémoire, mais

des mercis tout particuliers à Domi, Maxime et Jean-Michel ; à Hugues, Cathy et au petit bonhomme pêchu, pour les petites bouffes chez vous et pour les déambulations dans les rues de Florence ; à Cyrille, Anne-Claire et aux deux parasites, pour tous ces week end si sympas à Puen ; à Loïc, Gis et Léa pour les soirées épicuriennes, l'accueil familiale, le Noël sous les tropiques et pour la trilogie (chocolat noir/whisky/barreau de chaise...Pas croyable !); à Manu pour les discussions voile/voyage/epoxy ; et à tous les engins de la station : Anne-Laure, Pierre, Chanel et compagnie...

Je reviens en France, (fait froid ici !) direction Paris et l'équipe de l'unité Plasticité du Génome bactérien de l'Institut Pasteur: merci à Didier de m'avoir accueilli là-bas un nombre incalculable de fois, parfois à l'improviste et de s'être tant intéressé à mes plasmides récalcitrants, merci à Magali, Anne-Marie, Odile, Marie, David, Guillaume aussi mais c'est limite (au fait je suis pas une crevette ok !), à Souris, aux « dames de la cuisine », à Jo... l'incroyable gobeur d'huître (personne n'a su réussir ton exploit...j'en ris encore gnarck gnarck) et enfin merci à Fredo et à zouzouille pour les papotages en terrasse toute l'année, tenus par les chips et la blonde, qu'il vente ou qu'il pleuve.

Un profond merci à ceux que j'ai rencontré et avec qui j'ai partagé de bien chouettes moments d'amitié : Ben (autant j'écris un dico pour comprendre ce que tu racontes), Pascaline et les vocalises dans les couloirs, Babas (sacré Babas !), Billy (sacré Billy aussi !), Léo et Titi (500 gr l'entrecôte, saignante !), tête d'Olive et le gouren partagé, Claire, mon Ron (étrange hybride Bretonno-caldochoquebécois « l'engin de tabernac' madoué, ah ça gast ! »), mon Juju (obsessionnel de l'huître polyploïde, hybride étrange entre Ziltoïd The Omnicient et un innocent chérubin ornithologue), ma petite Angélique (je préfère rien dire, trop peur que tu me jettes un sortilège en faisant les trucs bizarres avec tes doigts), mon Nico et sa petite famille maintenant je suis trop content (ta poésie nous manque mon ami), mon Rem's (mon Viscacha, mon frangin, mon pot), mon Jean-Coco (alors que dire...tout ce qui me viens à l'esprit est très très compromettant et très embarrassant pour tout le monde...je crois que je préfère me taire), mon Stanou (à l'avenir, aux voiles gonflées, aux voyages, on y est presque !), ma Sophie (...), ma famille (que les alizés vous emportent loin ou vous le souhaitez, on s'y retrouvera).

# SOMMAIRE

<b>Index des figures</b>	<b>7</b>
<b>Index des tableaux</b>	<b>10</b>
<b>Introduction générale et objectifs de l'étude</b>	<b>12</b>
<b>Développement de l'aquaculture</b>	<b>12</b>
<b>Freins au développement de l'aquaculture</b>	<b>12</b>
I Facteurs ayant des effets négatifs extérieurs au système de production aquacole.	12
II Facteurs négatifs à l'intérieur du système aquacole	13
<b>Aquaculture de la crevette dans le monde</b>	<b>13</b>
I Généralités	13
II Développement des maladies en aquaculture de la crevette	14
III Gestion des maladies d'origine bactérienne	15
<b>Production aquacole de la crevette en Nouvelle-Calédonie</b>	<b>17</b>
I Données historiques, économiques et sociales de la production de la crevette en Nouvelle-Calédonie	17
II Freins au développement de la production aquacole en Nouvelle-Calédonie	19
II.1 Données historiques de la production : deux crises successives	19
II.2 Le programme DESANS	20
II.3 Résumé de l'étude DESANS sur le Syndrome 93	20
II.4 Etat de l'art sur le Syndrome d'été au commencement de ce travail de thèse	22
<b>Objectifs de ce travail de thèse : trois grands chapitres</b>	<b>25</b>
I Etude de la variabilité génétique d'une collection d'isolats de <i>V. nigripulchritudo</i> par des approches de typage moléculaire	25
II Identification de marqueurs génétiques de la virulence	25
III Mise en évidence d'un plasmide associé à la virulence : pSFn1	26

<b>Modèle biologique : la crevette bleue du Pacifique, <i>Litopenaeus stylirostris</i></b>	<b>27</b>
I Systématique et répartition de la crevette <i>L. stylirostris</i>	27
II Ecologie et biologie	27
II.1 Données anatomiques et physiologiques	27
II.2 Reproduction de <i>L. stylirostris</i>	29
II.3 Immunité chez les crevettes et mécanismes de défense	30
<b>Les bactéries du genre <i>Vibrio</i></b>	<b>34</b>
I Taxonomie et caractéristiques générales du genre <i>Vibrio</i>	34
II Espèces de <i>Vibrio</i> pathogènes	38
II.1 Espèces de <i>Vibrio</i> pathogènes chez l'Homme	38
II.1.1 <i>Vibrio cholerae</i>	38
II.1.1.1 Facteurs de virulence « majeurs » chez <i>V. cholerae</i>	40
II.1.1.2 Facteurs de virulence « accessoires » chez <i>V. cholerae</i>	42
II.1.2 <i>Vibrio vulnificus</i>	44
II.1.2.1 Facteurs de virulence « majeurs »	45
II.1.2.2 Facteurs de virulence « accessoires »	46
II.1.3 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	47
II.2 Espèces de <i>Vibrio</i> pathogènes chez les poissons	49
II.2.1 <i>Vibrio anguillarum</i>	49
II.2.2 <i>Vibrio salmonicida</i>	51
II.3 Espèces de <i>Vibrio</i> pathogènes chez les mollusques	52
II.4 Espèces de <i>Vibrio</i> pathogènes chez les coraux	52
II.4.1 <i>Vibrio shilonii</i>	53
II.4.2 <i>V. coralliilyticus</i>	54
II.4.3 <i>V. alginolyticus</i> et autres espèces de <i>Vibrio</i>	54
II.5 Espèces de <i>Vibrio</i> pathogènes chez les crustacés	54
III La notion de virulence chez les bactéries	56
<b>Transferts horizontaux de gènes (HGT)</b>	<b>58</b>
I Introduction et définition	58
II Mécanismes des HGT	59
II.1 La transformation	60
II.2 La transduction	61

II.3 La conjugaison	61
II.4 Maintien du matériel génétique transféré	63
III Mise en évidence de HGT	64
IV Mécanismes de virulence associés aux HGT	65
V Régulation de l'expression des facteurs de virulence	66
V.1 Phage RS1 et l'antirépresseur <i>rstC</i> chez <i>V. cholerae</i>	66
V.2 Gène régulateur <i>toxT</i> de l'îlot VPI	67
VI Mécanismes acquis par HGT conférant un avantage sélectif	68
VI.1 Amélioration de l'avantage sélectif par résistance au système immunitaire	68
VI.2 Les sidérophores	68
VI.3 Résistance aux antibiotiques	69
VI.3.1 <i>Via</i> les transposons : exemple du transposon SXT-like de <i>V. cholerae</i>	69
VI.3.2 Les intégrons multirésistants	69
VII Conclusion	71

## Chapitre I

### Etude de la variabilité génétique de souches de *Vibrio nigripulchritudo* isolées en Nouvelle-Calédonie 75

<b>Introduction et objectifs</b>	<b>75</b>
I Matériels et méthodes pour l'étude de la variabilité génétique de souches de <i>V. nigripulchritudo</i> isolées en Nouvelle-Calédonie.	78
I.1 Collection de souches	78
I.1.1 Choix des souches	78
I.1.2 Préparation des suspensions bactériennes et extraction d'ADN génomique	80
I.1.3 Caractérisation de la virulence par injection intra-musculaire d'une suspension bactérienne	81
I.2 Génotypage par Multi Locus Sequence Typing (MLST)	82
I.2.1 Amplification de gènes de ménage par PCR et purification	82
I.2.2 Réaction de séquence, purification et séquençage	83
I.2.3 Analyse phylogénétique	83
I.3 Génotypage par Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) <i>gyrB</i>	84
I.4 Génotypage par Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR)	84
II Résultats	84
II.1 Analyse de la variabilité génétique d'une collection de <i>V. nigripulchritudo</i> par une approche MLST	84
II.2 Profils de restriction de l'analyse en PCR-RFLP	86
II.3 Analyse de la variabilité génétique d'une collection de <i>V. nigripulchritudo</i> par une approche AP-PCR	87

III Discussion	89
<b>Conclusions</b>	<b>92</b>
<b>Chapitre II</b>	
<b>Identification de marqueurs génétiques de la virulence de souches de <i>V. nigripulchritudo</i> pathogènes en Nouvelle-Calédonie</b>	
	<b>95</b>
<b>Introduction et objectifs</b>	<b>95</b>
I Matériel et méthodes de la SSH	100
I.1 Choix des souches de <i>V. nigripulchritudo</i> pour la construction de la banque SSH : le Tester SFn1 et le Driver SFn118	100
I.2 Soustraction entre SFn1 et SFn118 par SSH, un rapide aperçu de la méthode	101
I.3 Criblage de la banque SSH par hybridation ADN/ADN en macro-array	102
I.4 Séquençage des fragments d'ADN spécifiques du Tester SFn1 et analyses des séquences	103
II Résultats	104
II.1 Gènes identifiés par SSH et potentiellement associés à la virulence	104
II.2 Corrélation entre marqueurs génétiques et statuts de virulence	107
II.3 Marqueurs génétiques d'intérêt identifiés par macro-array	109
II.3.1 Gènes potentiellement associés à la virulence	109
II.3.2 Fragments d'ADN présentant la signature d'éléments génétiques mobiles	109
II.3.3 COG inconnus et protéines hypothétiques conservées	109
III Discussion	111
<b>Conclusions</b>	<b>114</b>
<b>Chapitre III</b>	
<b>Mise en évidence d'un plasmide marqueur de la virulence pour <i>L. stylirostris</i> chez <i>V. nigripulchritudo</i> : pSFn1</b>	
	<b>119</b>
<b>Introduction</b>	<b>119</b>
I Matériels et méthodes	119
I.1 Purification d'ADN plasmidique	119
I.2 Séquençage des plasmides pSFn1 et pAK1 en « shot-gun »	120
I.3 Analyse des séquences	121
I.4 Caractérisation des plasmides purifiés dans la collection de souches de <i>V. nigripulchritudo</i>	121
I.5 Transfert du plasmide pSFn1 à des souches MP et NP de <i>V. nigripulchritudo</i> par conjugaison	122

I.5.1 Construction du vecteur plasmidique pSFn1-pUC18-pSW25T	122
I.5.2 Conjugaison	124
I.5.3 Courbes de croissance des transconjugants et maintien du plasmide pSFn1 chez les transconjugants sans pression de sélection antibiotique	124
I.5.4 Infections expérimentales de <i>L. stylirostris</i> avec les transconjugants injectés en intra-musculaire	124
II Résultats	125
II.1 Identification et organisation génétique du plasmide pSFn1	125
II.2 Identification et caractérisation de plasmides dans une collection de souches de <i>V. nigripulchritudo</i>	126
II.3 Séquençage du plasmide pAK1 et analyse synténique entre les deux plasmides pSFn1 et pAK1	127
II.4 Les transconjugants <i>V. nigripulchritudo</i> /pSFn1-pUC18-pSW25T	129
II.5 Infections expérimentales par injection intra-musculaire de <i>L. stylirostris</i> par les transconjugants	130
III Discussion	132
<b>Conclusion</b>	<b>138</b>
<hr/>	
<b>Conclusion générale et perspectives</b>	<b>139</b>
<hr/>	
<b>Références bibliographiques</b>	<b>143</b>
<hr/>	
<b>Annexes</b>	<b>167</b>
<hr/>	
<b>Annexe I - Article 1: Molecular epidemiology of <i>Vibrio nigripulchritudo</i>, a pathogen of cultured penaeid shrimp (<i>Litopenaeus stylirostris</i>) in New Caledonia</b>	<b>168</b>
<b>Annexe II - Article 2: Sequence polymorphism-based identification and quantification of <i>Vibrio nigripulchritudo</i> at the species and subspecies level targeting an emerging pathogen for cultured shrimp in New Caledonia</b>	<b>181</b>
<b>Annexe III - Article 3: Correlation between the detection of a plasmid and high virulence of <i>Vibrio nigripulchritudo</i>, a pathogen of the shrimp <i>Litopenaeus stylirostris</i></b>	<b>191</b>
<b>Annexe IV - Article 4: Emergence de maladies chez les organismes d'intérêt aquacole : quelques scénarios illustrés d'exemples</b>	<b>217</b>



## Index des figures

<b>Figure 1:</b> Evolution de la production des crevettes pénéides au niveau mondial	14
<b>Figure 2:</b> Diagramme de Sniezsko	17
<b>Figure 3:</b> Evolution de la production annuelle de crevettes de Nouvelle-Calédonie	18
<b>Figure 4:</b> Localisation des 19 fermes de production de la crevette <i>L. stylirostris</i> en Nouvelle-Calédonie, des 5 écloséries et des 2 centres IFREMER	19
<b>Figure 5:</b> Schéma théorique de l'apparition du Syndrome 93	21
<b>Figure 6:</b> Vue aérienne de la ferme aquacole de crevette Sea Farm en Nouvelle-Calédonie	22
<b>Figure 7:</b> Localisation des trois fermes aujourd'hui affectées par le Syndrome d'été	23
<b>Figure 8:</b> Profils types des cinétiques de mortalité de crevettes <i>L. stylirostris</i> infectées par trois pathotypes distincts de <i>V. nigripulchritudo</i>	24
<b>Figure 9:</b> Anatomie générale d'une crevette pénéide	28
<b>Figure 10:</b> Anatomie des organes reproducteurs mâle et femelle chez les crevettes pénéides	28
<b>Figure 11:</b> Cycle biologique naturel des crevettes pénéides	29
<b>Figure 12:</b> Représentation schématique du système Prophénoloxydase chez les Arthropodes	31
<b>Figure 13:</b> Représentation schématique du choc respiratoire intervenant après internalisation d'un corps étrangers dans le phagocyte	32
<b>Figure 14:</b> Modèle d'action des peptides antimicrobiens chez les crevettes pénéides	33
<b>Figure 15:</b> Résolution taxonomique des outils de typage les plus couramment utilisés	35
<b>Figure 16:</b> Arbre phylogénétique en méthode neighbor-joining, sur la base des séquences concatémérisées 16S rRNA, <i>recA</i> et <i>rpoA</i> (2,898 bp), mettant en évidence différents groupes de <i>Vibrio</i>	36
<b>Figure 17:</b> Modèle des facteurs environnementaux impliqués dans la transmission du cholera	39
<b>Figure 18:</b> Structure des phages RS1, CTX et de l'opéron RTX chez <i>V. cholerae</i>	40
<b>Figure 19:</b> La toxine cholérique CT, expression, assemblage et excrétion	40
<b>Figure 20:</b> La toxine cholérique CT, mode d'action	41
<b>Figure 21:</b> Structure des LPS et de la capsule des sérogroupes O1 et O139 de <i>V. cholerae</i>	44
<b>Figure 22:</b> Représentation schématique du système de sécrétion de type III (TTSS)	49
<b>Figure 23:</b> Carte du plasmide pJM1 de <i>V. anguillarum</i> 775	51

---

<b>Figure 24:</b> Transport du fer chez <i>V. anguillarum</i> 775 via le sidérophore anguibactine	51
<b>Figure 25:</b> Représentation schématique des mécanismes de maintien d'ADN exogène transféré dans une bactérie par HGT	60
<b>Figure 26:</b> Représentation schématique de la conversion du sérotype O1 en sérotype O139 par un mécanisme de transformation induit par la chitine	61
<b>Figure 27</b> Représentation schématique de la conjugaison d'un plasmide conjugatif	62
<b>Figure 28:</b> Représentation schématique du système d'addiction chez les bactéries au niveau plasmidique	64
<b>Figure 29:</b> Cascade de régulation de la transcription de <i>ctx</i> et <i>tcp</i> chez <i>V. cholerae</i>	67
<b>Figure 30:</b> Modèle d'échange de cassettes d'un intégron	70
<b>Figure 31:</b> Salle d'infection expérimentale de l'IFREMER de Nouvelle-Calédonie	81
<b>Figure 32:</b> Arbre phylogénétique issu de l'étude MLST sur 24 souches de <i>V. nigripulchritudo</i> , construit à partir des séquences de six gènes <i>rctB</i> , <i>toxR</i> , <i>16S rRNA</i> , <i>rpoD</i> , <i>recA</i> et <i>gyrB</i> concatémérisées (3430 pb)	85
<b>Figure 33:</b> Profils de PCR-RFLP obtenus à partir des produits de PCR <i>gyrB</i> digérés par <i>AluI</i> des 24 souches de <i>V. nigripulchritudo</i> également étudiées en MLST	86
<b>Figure 34:</b> Exemple de profils d'AP-PCR obtenus avec l'amorce SP à partir de souches de <i>V. nigripulchritudo</i>	87
<b>Figure 35:</b> Dendrogramme dessiné sur la base d'une matrice type présence/absence des amplicons majoritaires issus de l'AP-PCR utilisant les amorces RSP et SP	88
<b>Figure 36:</b> Représentation schématique de la STM	97
<b>Figure 37:</b> Comparaison des approches de mutagenèse aléatoire par transposons (RTM) et Signature-tagged Transposon Mutagenesis (STM)	98
<b>Figure 38:</b> Cinétique de survie de crevettes <i>L. stylirostris</i> à une infection expérimentale par une injection intra-musculaire des souches de <i>V. nigripulchritudo</i> SFn1 et SFn118, selon la dose injectée	100
<b>Figure 39:</b> Représentation schématique du principe de la SSH	102
<b>Figure 40:</b> Fonctions hypothétiques des 78 fragments d'ADN sélectionnés à l'issue de la SSH et du macro-array	111
<b>Figure 41:</b> Principe de la construction du vecteur pSFn-pUC18-pSW25T pour l'approche de conjugaison	123
<b>Figure 42:</b> Représentation graphique du plasmide pSFn1	125
<b>Figure 43:</b> Profils de restriction <i>EcoRI</i> , <i>XhoI</i> du plasmide de SFn1	127
<b>Figure 44:</b> Représentation graphique du plasmide pAK1	128

- Figure 45:** Comparaison linéaire des plasmides pSFn1 et pAK1 129
- Figure 46:** Courbes de croissance du transconjugant SFn118pSFn1 et de la souche sauvage SFn118 en présence ou non d'ampicilline 130
- Figure 47:** Courbes de survie de *L. stylirostris* jusqu'à 72 heures post-infection, après injection intramusculaire du transconjugant Wn13pSFn1 131
- Figure 48:** Courbes de survie de *L. stylirostris* jusqu'à 72 heures post-infection, après injection intramusculaire du transconjugants SFn118pSFn1 131

## Index des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Isolats de <i>V. nigripulchritudo</i> utilisés pour les études MLST et AP-PCR	80
<b>Tableau 2:</b> Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour l'étude en MLST et en AP-PCR	83
<b>Tableau 3:</b> Analyse des séquences spécifiques de SFn1 issues de la SSH et spécifiant des protéines potentiellement impliquées dans la virulence	104
<b>Tableau 4:</b> Tableau récapitulatif des résultats d'hybridations ADN/ADN obtenus en macro-arrays, en utilisant 78 fragments d'ADN issus de la banque SSH et des sondes ADN générées à partir de chacune de 58 souches de la collection <i>V. nigripulchritudo</i> précédemment typées	108
<b>Tableau 5:</b> Analyse des fragments d'ADN issus de la SSH qui sont spécifiques des souches HP du groupe phylogénétique A et de l'ensemble des souches HP et MP du groupe A	110
<b>Tableau 6:</b> Analyse des fragments d'ADN issus de la SSH qui sont spécifiques des souches virulentes des groupes phylogénétiques A et B	111
<b>Tableau 7:</b> Souches de <i>E. coli</i> utilisées dans cette étude	123
<b>Tableau 8:</b> Plasmides utilisés dans cette étude	123
<b>Tableau 9:</b> Analyse de la séquence des ORFs putatifs identifiés sur pSFn1	126
<b>Tableau 10:</b> Identification d'un ou plusieurs plasmides dans la collection de souches de <i>V. nigripulchritudo</i> typées par MLST et résultats d'hybridation en Southern blot entre les plasmides extraits et la sonde Z2Z3 marquée à la DIG	127
<b>Tableau 11:</b> Analyse de la séquence des ORFs putatifs identifiés sur pAK1	128

---

# **INTRODUCTION**

---

## **Introduction générale et objectifs de l'étude**

### **Développement de l'aquaculture**

Selon les données de la FAO (2006), la production mondiale des pêches de capture, tant marine que continentale, est caractérisée sur la période de 2000 à 2005 par une stagnation aux environs de 96 millions de tonnes. A l'inverse, la production des produits issus de l'aquaculture (hors production d'algues) s'est accrue passant sur la même période d'environ 35 à 48 millions de tonnes. Ainsi, l'augmentation de l'offre aquacole ayant plus que compensé les effets de la stagnation des pêches de capture et de la croissance démographique, les disponibilités par habitant sont restées à peu près au même niveau depuis 2000, soit environ 16,5 kg de produits marins par habitant et par an. L'aquaculture continue de croître plus rapidement que tous les autres secteurs de production alimentaire d'origine animale, à un taux moyen annuel de 8,8% depuis 1970, contre seulement 1,2% pour les pêches de capture et 2,8% pour les systèmes terrestres de production animale durant la même période.

L'aquaculture apparaît donc jouer aujourd'hui un rôle primordial dans l'apport de protéines animales d'origine aquatique pour la consommation humaine et à ce titre constitue une problématique de développement durable à l'échelle mondiale.

### **Freins au développement de l'aquaculture**

L'aquaculture rencontre aujourd'hui deux types de problèmes pouvant entraver son développement : d'abord des facteurs dus à l'activité de production aquacole et pouvant avoir des effets négatifs sur l'environnement écologique, économique et social extérieur ; ensuite des facteurs entravant l'activité de production aquacole au niveau interne.

#### **I Facteurs ayant des effets négatifs extérieurs au système de production aquacole**

Dans nombre de pays producteurs, notamment dans le continent asiatique et la zone pacifique, l'aquaculture était traditionnellement développée sur un mode intégré, à l'échelle familiale ou locale. Ces systèmes de production aquacoles ne présentaient donc qu'un faible impact d'un point de vue économique et écologique. Le développement progressif de l'aquaculture en tant qu'activité commerciale soumise aux lois du marché, a entraîné une rupture avec le mode de production traditionnel, avec notamment des surfaces de production très élargies en ce qui concerne les systèmes extensifs, ou alors la recherche d'un rendement à l'hectare le plus performant possible pour des systèmes de plus en plus intensifiés. Ces modifications notables ont entraîné un ensemble d'effets

pouvant impacter les écosystèmes. La FAO a défini un certain nombre de ces effets (rapport SOFIA 2006, [http://www.fao.org/sof/sofia/index\\_fr.htm](http://www.fao.org/sof/sofia/index_fr.htm)).

- une pression croissante sur les pêches pour l'obtention de farine et d'huile de poisson, principaux ingrédients des aliments destinés aux espèces élevées carnivores et omnivores,
- des modifications qualitatives et quantitatives des communautés benthiques,
- l'eutrophisation des lacs ou des zones côtières,
- la concurrence pour l'approvisionnement en ressources conduisant dans certains cas à leur épuisement (en eau douce par exemple),
- la perturbation, voire la restructuration permanente des environnements biologiques et/ou sociaux,
- des effets négatifs induits par la fuite des espèces élevées,
- l'impact environnemental et pour la santé humaine des produits chimiques utilisés pour le contrôle ou le traitement des maladies.

## II Facteurs négatifs à l'intérieur du système aquacole

Il existe par ailleurs des facteurs inhérents aux filières aquacoles. L'un des freins les plus importants qui constitue un véritable enjeu pour l'avenir de l'aquaculture reste le développement de maladies dans les élevages aquacoles. Ces maladies engendrées par la combinaison d'un ensemble de facteurs extrêmement complexes peuvent facilement remettre en cause la pérennité des sites de production. Un autre facteur à mettre en avant est celui de l'appauvrissement génétique des espèces élevées, dû notamment à l'effet de « goulot d'étranglement » provoqué par les faibles effectifs en animaux utilisés au moment de la constitution de l'élevage et aux croisements consanguins.

Dans l'optique non seulement de pérenniser les filières aquacoles mais également de permettre la poursuite du développement de l'aquaculture dans le monde, il convient donc d'étudier l'ensemble de ces effets dans des plans de gestion globaux par des approches écosystémiques et intégratives.

## **Aquaculture de la crevette dans le monde**

### I Généralités

L'aquaculture de la crevette a démarré dans les années 1970 et a connu depuis une croissance significative. Elle s'est considérablement accrue entre 2002 et 2004, devenant la branche aquacole la plus florissante avec un taux de croissance de 28,7% sur cette période (FAO, 2006) et 2,6 millions de tonnes produites en 2005, contre 5% environ pour la filière piscicole en eau douce. En termes de

valeur, cette filière se situe au deuxième rang des échanges mondiaux aquacoles après les poissons d'eau douce. Quelques pays dominent la production. La Chine se situe à la première place des pays producteurs, suivie par la Thaïlande, l'Indonésie, le Vietnam, le Brésil, le Mexique et l'Équateur. Le marché de l'exportation vise principalement les pays de l'Union Européenne, le Japon et les USA. De nombreuses espèces sont aujourd'hui produites (Figure 1), mais trois dominent le marché et représentaient 86% de la production mondiale en 2000 : il s'agit de la crevette à pattes blanches (*L. vannamei*), de la crevette tigre (*P. monodon*) et de la crevette charnue (*Fenneropenaeus chinensis*).

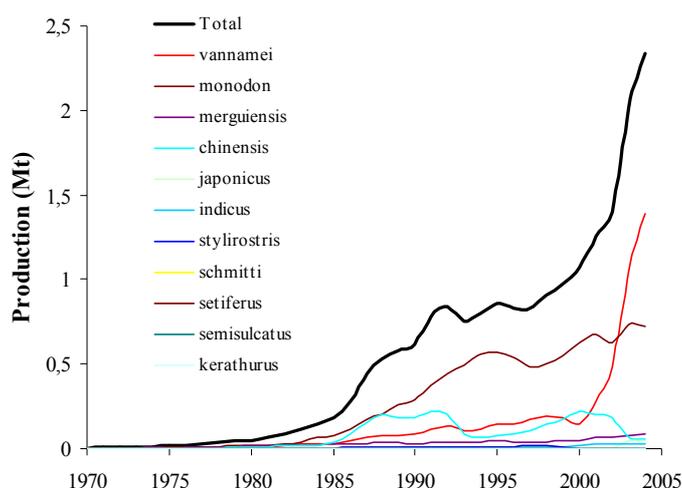


Figure 1 : Evolution de la production des crevettes pénéides au niveau mondial. Les espèces sont classées par niveau de production pour l'année 2004 (FAO, 2006)

## II Développement des maladies en aquaculture de la crevette

Si l'aquaculture de la crevette reste florissante, des pertes conséquentes associées à des maladies ont été rencontrées dans nombre de pays producteurs depuis les années 1980 (Kautsky *et al.*, 2000). Des maladies non infectieuses ont été observées, liées notamment à l'alimentation, aux conditions environnementales, à la présence d'éléments toxiques ; mais le risque majeur pour les élevages reste les maladies infectieuses associées à des protistes, des champignons, ou des maladies d'origine bactérienne ou virale (Lightner and Redman, 1998). Les pertes les plus importantes répertoriées restent dues à des virus. L'office International des Épizooties (OIE) a répertorié six maladies virales principales chez les crevettes pénéides : le Syndrome de Taura, la maladie des points blancs, la maladie de la tête jaune, la baculovirose tétraédrique (*Baculovirus penaei*), la baculovirose sphérique (baculovirus spécifique de *Penaeus monodon*), la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse. En ce qui concerne les bactérioses, l'OIE ne répertorie aucune maladie. Néanmoins des mortalités significatives ont été observées, associées à des bactéries pathogènes aussi bien dans les phases larvaires de la production qu'en phase de grossissement. La plupart de ces bactéries pathogènes identifiées, appartiennent au genre *Vibrio*: par exemple *V. harveyi*, *V. alginolyticus*,

*V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. penaeicida*, ou encore *V. damsela* (Lightner, 1998 ; De La Peña *et al.*, 1992 ; Song *et al.* 1993 ; Jiravanichpaisal *et al.*, 1994 ; Ishimaru *et al.*, 1995 ; Lee *et al.*, 1997 ; Alday-sanz *et al.*, 2002 ; Liu *et al.*, 2004). Cette liste reste non exhaustive mais rapporte bien l'existence d'un réel problème zoonositaire lié aux vibrioses dans l'aquaculture de la crevette dans le monde.

### III Gestion des maladies d'origine bactérienne

Le fait que le système immunitaire des crevettes soit non adaptatif par l'absence de processus de mémorisation à plus ou moins long terme de la réponse immune, empêche toute stratégie de vaccination vis-à-vis de bactéries pathogènes (Bachère, 2000). Cependant, d'autres stratégies de lutte notamment vis-à-vis des maladies bactériennes sont possibles.

Traditionnellement le contrôle des bactérioses dans les élevages de crevettes pénaïdes repose sur l'utilisation d'antibiotiques. Schématiquement, on peut distinguer deux circonstances d'utilisation : soit le traitement d'une bactériose (antibiothérapie), lorsque la maladie a été diagnostiquée et que le ou les agents responsables ont été identifiés, soit en prophylaxie (antibioprévention), quand on veut prévenir une infection avant son apparition. Cela suppose que l'on ait parfaitement décrit le phénomène morbide au préalable et que l'on connaisse les situations à risque susceptibles de provoquer son apparition. L'utilisation massive d'antibiotiques, souvent irréfléchie, a abouti à l'émergence et à l'expansion de souches bactériennes antibiorésistantes et présentes non seulement dans les élevages, mais relarguées également hors des structures d'élevage (Weston *et al.*, 1996 ; Le *et al.*, 2005 ; FAO, OIE, WHO, 2006). Pourtant, dès 1980, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) déclarait : « Les résistances de plus en plus fréquentes chez les bactéries posent d'ores et déjà des difficultés dans la thérapeutique humaine et vétérinaire et pourraient, si la tendance actuelle se maintient, rendre les antibiotiques beaucoup moins efficaces qu'ils ne le sont aujourd'hui, privant l'humanité d'une arme extrêmement précieuse contre de nombreuses maladies. L'apparition des souches bactériennes antibiorésistantes est étroitement liée aux problèmes d'hygiène de l'environnement ». Si aujourd'hui, l'usage d'antibiotiques existe toujours en aquaculture, leur utilisation est particulièrement remise en cause du fait des risques collatéraux pour l'environnement et la santé humaine. Cette voie thérapeutique et prophylactique ne semble donc pas être une solution pérenne pour le traitement des bactérioses et notamment des vibrioses en aquaculture.

La recherche se tourne également vers l'utilisation de bactéries probiotiques comme substitut aux antibiotiques. Fuller en 1989 qualifie ces probiotiques de « compléments alimentaires microbiens qui affectent positivement l'animal-hôte par amélioration de la balance microbienne intestinale ». En aquaculture, l'utilisation de probiotiques est relativement récente, puisque les premiers travaux remontent à Kozaka en 1986. Dans un premier temps les probiotiques ont été utilisés de façon empirique, mais aujourd'hui on assiste à un essor de ce domaine de recherche. Des bactéries marines

ont été sélectionnées pour leur capacité anti-bactérienne (Holmström et Kjelleberg, 1999 ; Chythanya *et al.*, 2001), mais ce sont principalement les souches bactériennes utilisées en élevage terrestre qui sont transférées dans les systèmes aquacoles (Gomez-Gil *et al.*, 2000 ; Vázquez *et al.*, 2005). Le mode d'action le plus répandu des probiotiques se traduit par le phénomène d'exclusion compétitive avec les pathogènes, ce qui permettrait un remaniement de la composition bactérienne dans l'eau, dans le sédiment et dans le tractus gastro-intestinal des crevettes (Moriarty, 2000). Cette exclusion compétitive peut se faire sur la base de deux modes d'action : par l'émission de substances antibiotiques tels que l'éthanol, des acides organiques, le peroxyde d'hydrogène (Annuk *et al.*, 2003) et de bactériocines (composés inhibiteurs spécifiques d'origine peptidique ou protéique) ; et par une compétition au niveau de la colonisation de l'espace, aux nutriments et à l'oxygène.

La constitution d'un élevage aquacole peut entraîner un effet de « goulot d'étranglement » se traduisant par un appauvrissement de la variabilité génétique de l'espèce cultivée (Sbordoni *et al.*, 1986). Par ailleurs, les croisements consanguins dans un système aquacole « clos », c'est-à-dire sans apports de « sang neuf » venu par exemple de géniteurs ou de larves directement prélevés dans l'environnement extérieur, peuvent entraîner les mêmes effets. Cette perte de variabilité génétique peut s'accompagner, dans un contexte de maladie, d'une diminution de l'adaptabilité de l'espèce cultivée à un agent pathogène par exemple et donc d'une plus grande sensibilité. Des stratégies d'introduction de sang neuf peuvent améliorer cette diversité génétique et ainsi apporter une meilleure réponse à une maladie (Goyard *et al.*, sous presse). D'autre part, de mêmes effets peuvent être apportés par des programmes d'amélioration génétique de l'espèce cultivée présentant suffisamment de polymorphisme génétique, sur la base de sélections de lignées dites « résistantes » et « sensibles » à la maladie. Par exemple, des lignées présentant des survies significativement différentielles à un pathogène donné lors d'infections expérimentales ou naturelles peuvent être sélectionnées.

Enfin, une analyse globale de la maladie semble indispensable à la mise au point de solutions pérennes. La théorie développée par Snieszko (1973) repose sur l'interaction de plusieurs facteurs pour l'expression d'une maladie (Figure 2), qui peut donc résulter de conditions environnementales défavorables, d'une sensibilité particulière de l'hôte et enfin être le fait du pathogène. Chacun de ces facteurs, ou des facteurs combinés peuvent prendre un poids plus important dans les interactions aboutissant au déclenchement de la maladie. Une gestion intégrative doit viser à comprendre ces interactions, à identifier les facteurs incriminés et à en mesurer l'impact.

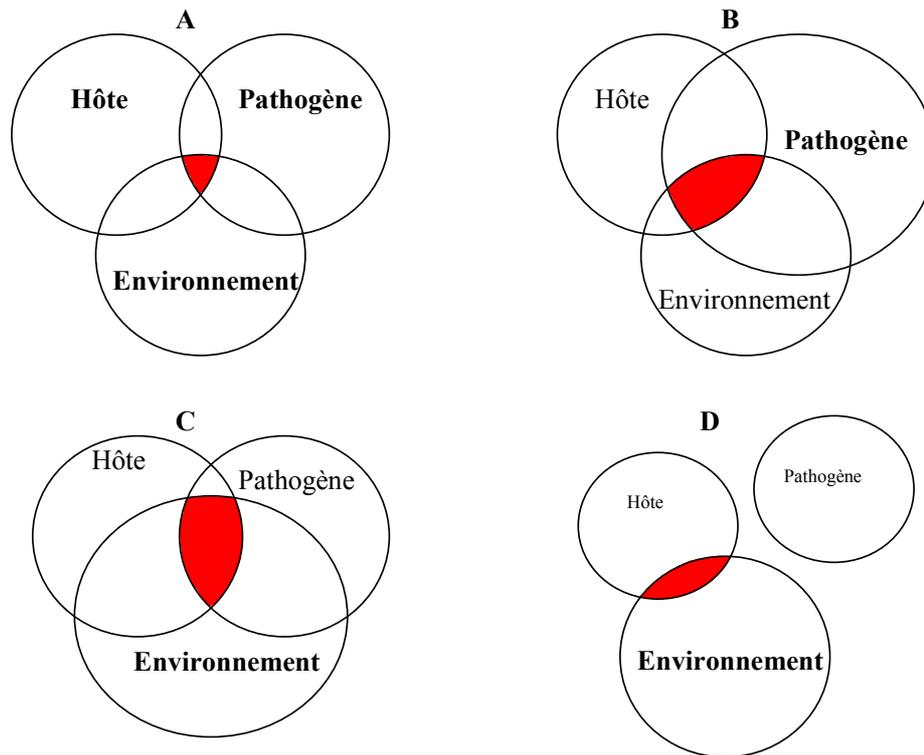


Figure 2 : Schémas représentant l'interaction complexe entre l'hôte, son environnement et le pathogène, menant à l'expression (en rouge) d'une maladie multifactorielle (Adaptés de Sniezsko, 1973 et de Lightner et Redman, 1998).

- A) l'intensité de la maladie augmente proportionnellement à la circonférence de chaque cercle (augmentation du nombre de pathogènes, de leur virulence, perturbation de l'environnement, stress des animaux en élevage...)
- B) Illustre une maladie avec un pathogène très virulent
- C) Illustre un environnement fortement dégradé
- D) Illustre une maladie sans intervention d'un pathogène (éléments toxiques, produit chimique...)

## Production aquacole de la crevette en Nouvelle-Calédonie

### I Données historiques, économiques et sociales de la production de la crevette en Nouvelle-Calédonie

La production de crevettes en Nouvelle-Calédonie a été initiée en 1972 suite à l'introduction de la crevette bleue du Pacifique, *Litopenaeus stylirostris*, une espèce exotique d'intérêt aquacole originaire du Mexique. Le territoire calédonien disposait alors d'un ensemble de critères favorables au développement de la filière crevetticulture : des conditions climatiques idéales pour cette espèce de crevette avec l'alternance de saisons fraîches et chaudes, des étendues d'arrière-mangrove permettant potentiellement l'installation de nombreuses fermes, une volonté forte de la part des institutions politiques de développer l'aquaculture de crevettes et d'en faire un secteur clé du développement de

l'économie insulaire soutenu par des organismes de recherche. Dans les premiers temps la production se fit à titre expérimental par l'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) avec l'implantation d'un unique site de production et visant simplement le marché local. Dans un deuxième temps, à partir de 1983, la production privée a pris le relais, l'IFREMER apportant ses compétences techniques et scientifiques en soutien à une filière en pleine expansion. La production est passée de 16 tonnes en 1983, à 2200 tonnes en 2004 (Figure 3).

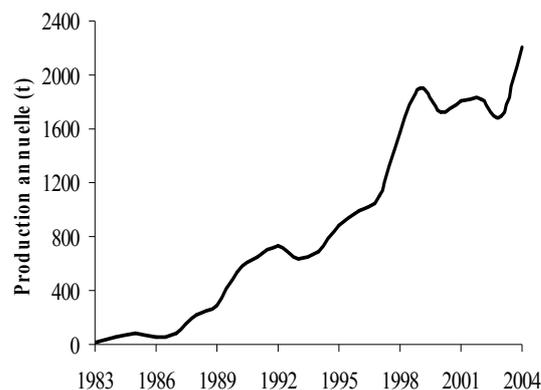


Figure 3 : Evolution de la production annuelle de crevettes de Nouvelle-Calédonie (LAC, 1999 ; GFA, 2004)

La construction d'un atelier de conditionnement destiné à l'exportation, la SOPAC (Société des Producteurs Aquacoles Calédoniens) répondant à un cahier des charges strict, basé sur des normes d'élevage (absence de farines d'animaux terrestres pour l'alimentation, restriction de l'usage d'antibiotiques aux seuls élevages larvaires etc...) et sur une maîtrise de la qualité du produit (normes CEE), a permis de viser un marché basé sur la qualité du produit et orienté principalement vers l'Europe, l'Australie et le Japon, complétant les débouchés du marché local. Si ces tonnages ne représentent qu'une très faible part de la production mondiale de crevettes (de l'ordre de 0.1%), pour la Nouvelle-Calédonie, cette filière aquacole revêt une grande importance à plusieurs titres. Il s'agit d'abord du deuxième secteur d'exportation après le nickel ; les 19 fermes de grossissement actuelles sont principalement situées en « brousse », c'est-à-dire en dehors de la zone urbaine de la capitale Nouméa (Figure 4), contribuant ainsi à la décentralisation économique et au rééquilibrage des Provinces Nord et Sud ; ce secteur a permis en outre la création de 900 emplois, souvent peu qualifiés : 300 permanents et 600 occasionnels, pour 350 équivalents temps plein ; de plus cette activité dispose encore d'un fort potentiel de développement, principalement dans la Province Nord où de nombreux sites restent exploitables. En 2000, les chiffres prévisionnels de production visaient les 5000 tonnes et un doublement des surfaces d'élevage à l'horizon 2007.

Cependant le corollaire de cette croissance est une fragilité accrue de la filière. En effet, du fait de l'intensification des systèmes d'élevage, des risques nouveaux apparaissent, tant pour les proches écosystèmes littoraux que pour la filière elle-même, avec notamment l'émergence de maladies infectieuses d'étiologie bactérienne.



Figure 4 : Localisation des 19 fermes de production de la crevette *L. stylirostris* en Nouvelle-Calédonie, des 5 écloseries et des 2 centres IFREMER. PL pour post-larve

## II Freins au développement de la production aquacole en Nouvelle-Calédonie

### II.1 Données historiques de la production : deux crises successives (Figure 3)

La filière aquacole en Nouvelle-Calédonie est exempte de toute maladie d'origine virale répertoriée pouvant toucher les élevages de crevette. Le parvovirus IHNV (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus) a été détecté sur le territoire calédonien, mais la souche de crevette *Litopenaeus stylirostris* SPR43 sélectionnée à Tahiti avant le transfert en Nouvelle-Calédonie, a été démontrée résistante à cette virose (Weppe *et al.*, 1993).

Néanmoins, deux maladies infectieuses d'origine bactérienne sont apparues depuis quelques années, perturbant considérablement la production aquacole de crevettes néo-calédoniennes. La première, nommée le « Syndrome 93 », a été décrite pour la première fois au cours de l'hiver 1993 simultanément sur deux sites de productions proches géographiquement. Il s'agit d'une vibriose s'exprimant de façon saisonnière dont l'agent étiologique identifié est *V. penaeicida* (Costa *et al.*, 1998 ; Mermoud *et al.*, 1998 ; Goarant *et al.*, 1999 ; Saulnier *et al.*, 2000). L'épizootie s'est rapidement répandue à l'ensemble des sites de production conduisant ainsi à un arrêt de la production durant la période à risque, en saison froide. Quelques années plus tard fin 1997, une seconde maladie nommée le « Syndrome d'été », est apparue sur un site de production au cours de la saison chaude. Il s'agit là aussi d'une vibriose, à caractère septicémique, dont l'agent étiologique est *V. nigripulchritudo* (Goarant *et al.*, 2006a et b). Deux autres fermes ont été touchées depuis, dont une a déposé le bilan

deux ans après sa création. Le Syndrome d'été est la première maladie décrite associée à *V. nigripulchritudo*.

## II.2 Le programme DESANS

Les premières études menées sur ces deux maladies ont abouti à l'hypothèse que leurs déterminismes étaient multifactoriels, en répondant au schéma théorique proposé par Snieszko (Figure 2). Un programme multidisciplinaire a donc été mis en place par l'IFREMER et initié en 2002. Ce programme DésANS (DEfi SANTé Stylirostris) à l'instar du programme MOREST (MORTalités ESTivales) concernant les mortalités d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*, a été conçu de façon à étudier les trois compartiments hôte, environnement, pathogène afin de déterminer la nature des interactions conduisant à l'expression de la maladie et de proposer à plus ou moins long terme des solutions de « sortie de crise ».

Au niveau de l'hôte, les bases génétiques de la sensibilité des crevettes aux vibrioses ainsi que leur physiologie (stade de mue, déséquilibre métabolique, immunité) sont étudiées.

Au niveau de l'environnement, ce sont les paramètres biotiques du milieu (plancton, méiofaune) ainsi que des paramètres physico-chimiques (eutrophisation, température...) et des pratiques zootechniques qui sont investiguées.

Enfin, un troisième acteur fait l'objet de recherches. Il s'agit des agents infectieux, qui dans les deux maladies décrites appartiennent au genre *Vibrio*. Plusieurs travaux ont été développés : l'identification de l'agent étiologique des maladies, la définition des statuts de virulence par un outil d'infection expérimentale préalablement mis au point, le développement d'outils diagnostiques simples d'utilisation et suffisamment discriminants permettant par la suite des études épidémiologiques à plus grande échelle, la recherche de gènes associés à la virulence et enfin l'étude des mécanismes de virulence mis en jeu et leur modulation.

## II.3 Résumé de l'étude DESANS sur le Syndrome 93

Le Syndrome 93 a été observé pour la première fois fin mai 1993 pendant la période de transition entre la saison chaude et la saison froide. Cette année se caractérisait par une période de forte sécheresse qui a débuté fin 1992 due au phénomène climatique « El Niño » (Goarant *et al.*, 1996; Mermoud *et al.*, 1998). L'apparition des premières crevettes mortes était concomitante à des conditions « anormales » de milieu avec des températures froides et des salinités élevées (Goarant *et al.*, 1996). Si les chutes de température dans les bassins au moment de l'inter-saison, sont décrites comme un facteur nécessaire pour expliquer le déclenchement de la maladie, des études plus récentes (Lemonnier, 2007) tendent à montrer que la forte densité de crevettes dans les bassins serait un facteur essentiel expliquant l'intensité des mortalités dues au Syndrome 93 (Figure 5).

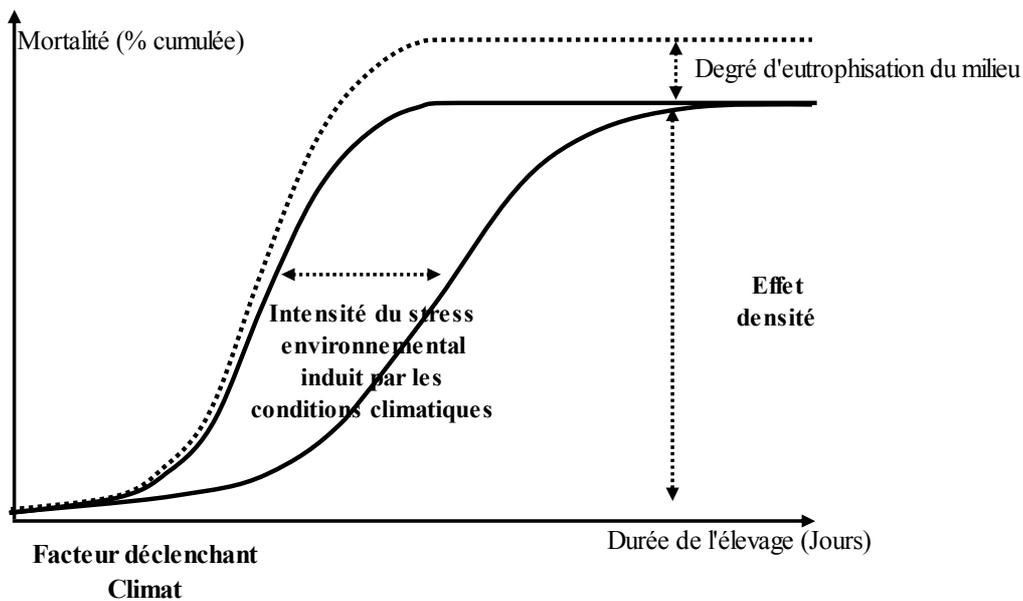


Figure 5 : Schéma théorique de l'apparition du Syndrome 93 développé à partir des résultats et des hypothèses de travail sur le syndrome 93. Les conditions climatiques pendant les périodes de transition entre les deux principales saisons seraient responsables d'un stress environnemental. L'intensité des mortalités à un instant T dépendrait de l'intensité de ce stress. La mortalité cumulée en % en fin d'élevage serait principalement liée à la densité initiale. Toutefois, une eutrophisation excessive du milieu est potentiellement un facteur d'intensification de la maladie et permettrait d'expliquer les mortalités les plus fortes (Lemonnier, 2007)

Cette maladie touche l'ensemble des fermes calédoniennes aussi bien les fermes intensives que semi-intensives. Sur le plan historique, son apparition est à relier à une évolution du système d'élevage et particulièrement à une augmentation des densités à l'ensemencement, que ce soit pour les bassins semi-intensifs ou intensifs et à une diminution de la durée des assècs (Mermoud *et al.*, 1998).

*V. penaeicida* est reconnu comme l'agent étiologique de la maladie : les isolats bactériens prélevés de l'hémolymphe de crevettes moribondes septicémiques appartiennent très majoritairement à l'espèce *V. penaeicida*, même si d'autres espèces, comme par exemple *V. nigripulchritudo*, ont pu être isolées ponctuellement sans pour autant être incriminées dans l'apparition de ces mortalités (Costa *et al.*, 1998 ; Goarant *et al.*, 1999). La virulence d'une collection de souches a été caractérisée par infection expérimentale et comparée à celle de la souche type isolée au Japon pathogène de crevettes *Marsupenaeus japonicus*, mettant en évidence le caractère hautement pathogène des souches calédoniennes (Saulnier *et al.*, 2000). On notera qu'il a été montré l'existence de crevettes porteuses saines, c'est-à-dire hébergeant des souches de *V. penaeicida* pathogènes dans l'hémolymphe sans expression de la maladie (Goarant *et al.* 2004). La température a un effet notable sur l'expression d'une exotoxine sécrétée dans les surnageants de culture bactérienne. Goarant *et al.* (2000), ont en effet montré que des surnageants de culture de *V. penaeicida* obtenus à 20°C étaient létaux pour la crevette après injection intramusculaire, alors que ceux obtenus à 30°C étaient dénués de toxicité. Goarant (2000) a qualifié le Syndrome 93 de complexe pathologique d'élevage intensif. Le Syndrome

93 ayant une très large distribution géographique en Nouvelle-Calédonie, il a abouti à un ralentissement conséquent de la production au cours de la saison fraîche entraînant ainsi une forte saisonnalité de l'activité aquacole.

#### II.4 Etat de l'art sur le Syndrome d'été au commencement de ce travail de thèse

Sea Farm est la première ferme à avoir été affectée par le Syndrome d'été en décembre 1997 (Figure 6).



Figure 6 : Vue aérienne de la ferme aquacole de crevette Sea Farm en Nouvelle-Calédonie, 2005 (source Zonéco)

Il s'agissait de la première ferme intensive de Nouvelle-Calédonie (forte densité en crevettes, bassins de taille réduite avec aération). Les survies associées à cette maladie furent immédiatement catastrophiques. Les élevages suivants ont confirmé ces résultats avec des survies finales à la pêche, équivalentes à celles observées pour le Syndrome 93, de l'ordre de 25% alors qu'à la normale elles sont supérieures ou égales à 60%. Cette maladie s'exprime après environ 50 jours d'élevage et apparaît sous forme de brèves flambées épizootiques conduisant à une forte mortalité devenant chronique ou récurrente et réapparaissant d'une année sur l'autre. Des modifications du protocole habituel d'élevage ont été apportées par l'éleveur au cours des différentes saisons chaudes 2000-2001 et 2001-2002 sans pour autant diminuer l'impact de la maladie (forte aération, utilisation de probiotiques, fonds de bassin curés). Seule une antibiothérapie préventive réalisée à titre expérimental avec de l'oxytétracycline (5 kg / tonne d'aliment) a permis de diminuer les mortalités (Goarant *et al.*,

2003). En 2003, une seconde ferme, Aigue Marine, située a proximité de la première, a été touchée par cette maladie avec des mortalités très importantes menant au dépôt de bilan seulement deux années plus tard. En 2006, une troisième ferme, FAO, a également présenté des mortalités de type Syndrome d'été, ainsi que le centre IFREMER DAC de Saint-Vincent (Figure 7).



Figure 7 : Localisation des trois fermes aujourd'hui affectées par le Syndrome d'été, du centre IFREMER et de la ferme Pénides de Ouano, où des souches de *V. nigripulchritudo* hautement pathogènes ont été isolées

Compte tenu de la situation déjà difficile de la production de crevette en Nouvelle-Calédonie, liée à l'abandon des élevages au cours de la saison fraîche, il est évident qu'une extension géographique du Syndrome d'été à l'ensemble des sites de production pourrait véritablement menacer la pérennité de la filière. A travers le programme DESANS, l'IFREMER s'est particulièrement appliqué à comprendre les interactions hôte/environnement/pathogène menant à l'expression du Syndrome d'été.

Les études menées sur les isolats bactériens issus de crevettes affectées par le Syndrome d'été, permettent de conclure qu'il s'agit d'une maladie correspondant à une vibriose septicémique due à *V. nigripulchritudo* (Goarant *et al.*, 2006a et b). La totalité des isolats bactériens associés au Syndrome d'été est hautement pathogène en infection expérimentale par injection intra-musculaire, avec moins de 20% de survie en deux jours, pour une dose de 50 à 500 UFC par crevette. Depuis 1995, a été établie une collection de souches de *V. nigripulchritudo* isolées dans différents contextes : des souches isolées de l'hémolymphe de crevettes moribondes affectées par le Syndrome 93 ou par le Syndrome d'été ; des souches issues de crevettes moribondes non caractéristiques dans des contextes différents de ces deux pathologies ; des souches isolées de crevettes saines hors contexte de mortalité ; des souches issues de différents compartiments de l'environnement (tableau X, chapitre I). La

pathogénicité de ces isolats bactériens a été étudiée en infection expérimentale par injection intramusculaire d'une suspension bactérienne et a permis de mettre en évidence trois statuts de virulence distincts (Figure 8) : des souches hautement pathogènes (HP) lorsque les survies étaient inférieures à 20% à deux jours post-infection ; des souches moyennement pathogènes (MP) lorsque les survies étaient comprises entre 20% et 80% ; des souches non pathogènes (NP) lorsque les survies étaient supérieures à 80%.

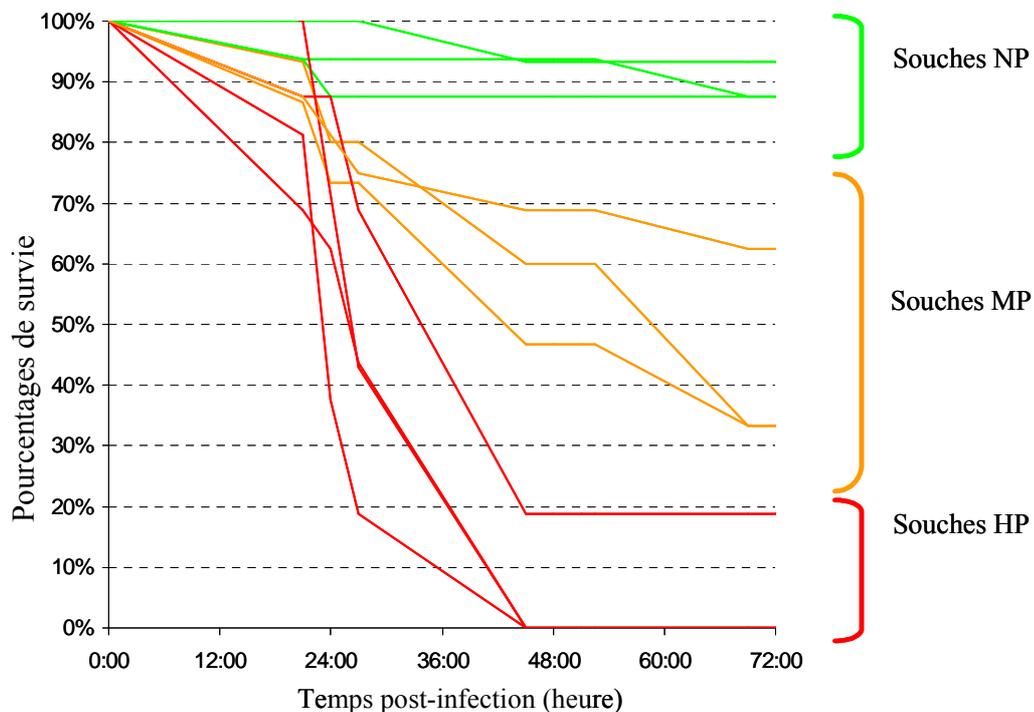


Figure 8 : Profils types des cinétiques de mortalité de crevettes *L. stylirostris* infectées par trois pathotypes distincts de *V. nigripulchritudo* : hautement pathogène (HP), moyennement pathogène (MP) et non pathogène (NP)

D'un point de vue phénotypique, on parvient facilement à identifier *V. nigripulchritudo* par une approche biochimique, l'ajout de 2% de glycérol au milieu de culture permettant de distinguer les colonies de cette espèce d'autres espèces bactériennes par la formation d'un pigment noir caractéristique (Bergey, 1984). Cependant l'identification de l'espèce ne permet pas de statuer sur la virulence mise en évidence par infection expérimentale, autrement dit, l'identification d'une souche de *V. nigripulchritudo* dans un échantillon ne signifiera pas qu'il s'agit d'une souche pathogène et a fortiori d'une souche hautement pathogène « HP » comme celle associée au Syndrome d'été. Par ailleurs, les infections expérimentales sont relativement lourdes à mettre en place en termes de temps et de moyens matériels et humains. Différentes études se devaient donc d'être développées afin de répondre à des problématiques de diagnostic, d'épidémiologie et de pathogenèse du Syndrome d'été.

## Objectifs de ce travail de thèse : trois grands chapitres

Ce travail de thèse a été initié dans le cadre du programme DESANS, sous l'impulsion de l'IFREMER et au sein de deux laboratoires : le Département Aquacole de Nouvelle-Calédonie et le Laboratoire de Génétique et de Pathologie de La Tremblade. Une collaboration a été développée avec l'Unité de Plasticité du Génome Bactérien de l'Institut Pasteur de Paris (CNRS URA2171). Un soutien financier a été apporté par le gouvernement de la Nouvelle-Calédonie et dans le cadre d'un GIS avec l'Institut de Génomique Marine (contrat Ministère de la Recherche n°0425).

Différentes études ont été menées au cours de ce travail de thèse afin de répondre à un certain nombre de problématiques concernant l'agent bactérien responsable du Syndrome d'été : dans le cadre de diagnostics et d'études épidémiologiques, il apparaissait primordial de développer des outils discriminants d'identification des souches HP associées au Syndrome d'été, fiables et faciles à mettre en œuvre, sans avoir à passer systématiquement par une caractérisation de la virulence *via* une infection expérimentale. Ensuite, pour comprendre les mécanismes fins du processus infectieux, il apparaissait nécessaire dans un premier temps d'identifier puis de caractériser les gènes codant des protéines potentiellement impliquées dans la virulence.

Trois grands chapitres ont été développés dans ce manuscrit de thèse :

### I Etude de la variabilité génétique d'une collection d'isolats de *V. nigripulchritudo* par des approches de typage moléculaire

Les objectifs à ce niveau sont multiples :

- Confirmation de l'appartenance des souches étudiées à l'espèce *V. nigripulchritudo*
- Estimation du degré de variabilité génétique des isolats bactériens et recherche de corrélation entre groupes phylogénétiques et statuts de virulence
- Comparaison des souches HP isolées dans un contexte de Syndrome d'été et de Syndrome 93
- Sélection des candidats HP et NP pour l'approche d'hybridation soustractive.

### II Identification de marqueurs génétiques de la virulence

Une hybridation soustractive, entre la souche HP de référence associée au Syndrome d'été et une souche NP, a été effectuée dans un premier temps. La distribution des fragments d'ADN issus de la banque soustractive a ensuite été étudiée dans une collection de souches de *V. nigripulchritudo* par une approche d'hybridation ADN/ADN en macro-arrays dans le but d'identifier des marqueurs génétiques de la virulence et des gènes codant des protéines potentiellement impliquées dans le processus infectieux.

### III Mise en évidence d'un plasmide associé à la virulence : pSFn1

Un plasmide associé à la virulence a été identifié dans la souche HP de référence et recherché dans une collection de souches de *V. nigripulchritudo*. Sa présence a été confirmée dans toutes (et seulement) les souches HP associées au syndrome d'été. Il a été entièrement séquencé et comparé à un autre plasmide présent dans une souche de *Vibrio shilonii*, associé au blanchiment du corail. La découverte de ce plasmide a permis d'ouvrir la discussion sur le rôle des éléments génétiques mobiles acquis par transfert horizontal de gènes (HGT) dans l'émergence de souches de *V. nigripulchritudo* HP en Nouvelle-Calédonie.

## Rappels bibliographiques

### **Modèle biologique : la crevette bleue du Pacifique, *Litopenaeus stylirostris***

#### I Systématique et répartition de la crevette *L. stylirostris*

La crevette *L. stylirostris* appartient à l'embranchement des *Artropoda*, ordre des *Decapoda*, famille des *Penaeidae*. Il s'agit d'une espèce de crevette pénéide originaire de l'est de l'Océan Pacifique, au niveau de l'Amérique centrale (Mexique, Salvador, Guatemala). Elle est élevée de façon extensive à Panama, semi-intensive à Hawaii et intensive en Equateur. Cette espèce a été importée en Nouvelle-Calédonie dans un but de production dans les années 1970.

#### II Ecologie et biologie

##### II.1 Données anatomiques et physiologiques (Figures 9 et 10)

La crevette *Litopenaeus stylirostris* adulte est caractérisée par un corps comprimé latéralement, un rostre très développé possédant huit dents sur son bord dorsal et trois ventralement, une cuticule lisse et légèrement pigmentée en bleu-vert, un réceptacle séminal ouvert appelé thélycum chez la femelle et un organe copulateur appelé pétasma chez le mâle.

*Litopenaeus stylirostris* vit en eau peu profonde de 0 à 30 mètres sur fonds vaseux ou sablonneux. Les juvéniles sont plus souvent présents au niveau des estuaires, alors que les adultes sont préférentiellement retrouvés en pleine mer.

Le cycle biologique de l'espèce comprend trois phases (Figure 11):

- La phase méroplanctonique et planctonique qui a lieu sur la côte en eaux saumâtres : stades larvaires Nauplius, Zoé et Mysis.
- La phase benthique au niveau des estuaires : post-larves et juvéniles.
- La phase de migration sexuelle durant laquelle les futurs géniteurs migrent vers le large pour se reproduire, puis rejoignent le littoral pour pondre.

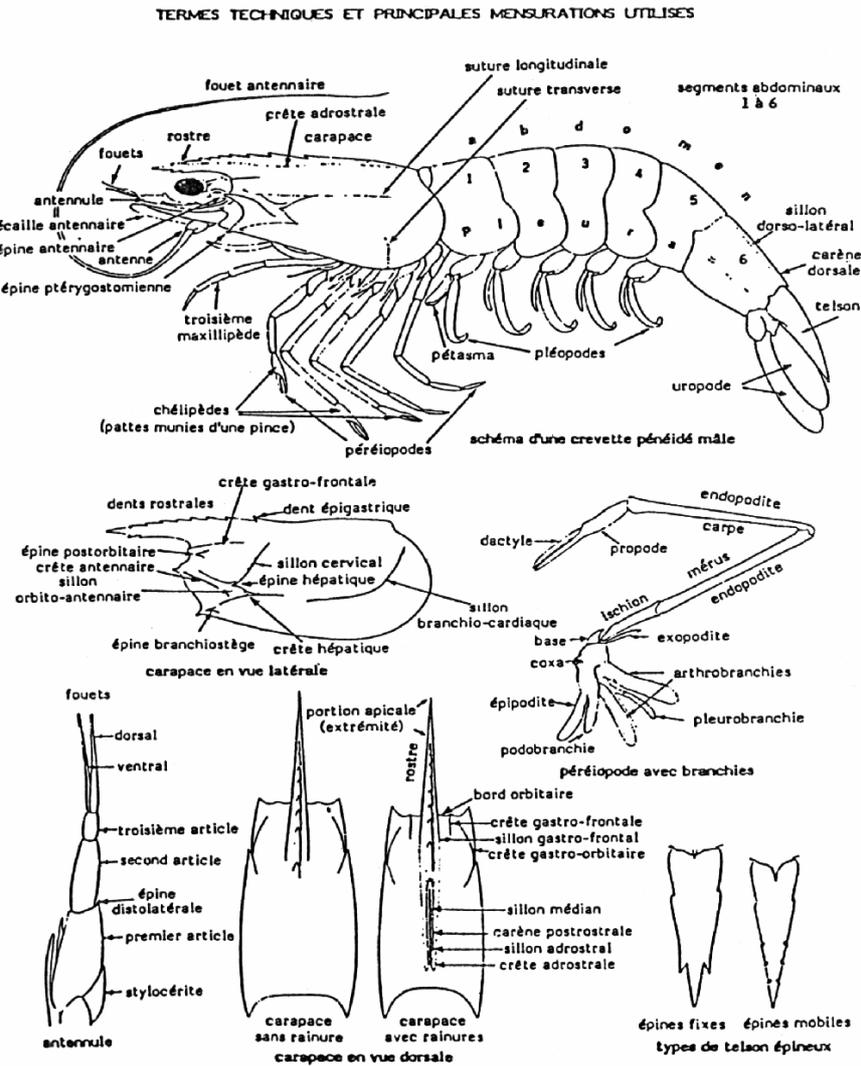


Figure 9 : Anatomie générale d'une crevette péneïde

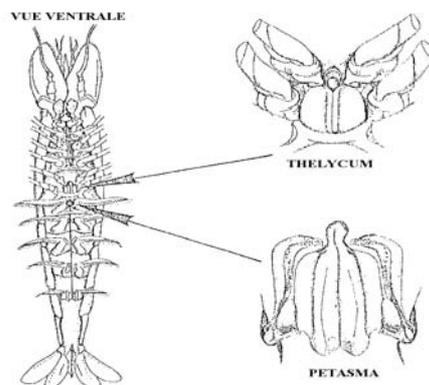


Figure 10 : Anatomie des organes reproducteurs mâle et femelle chez les crevettes péneïdes

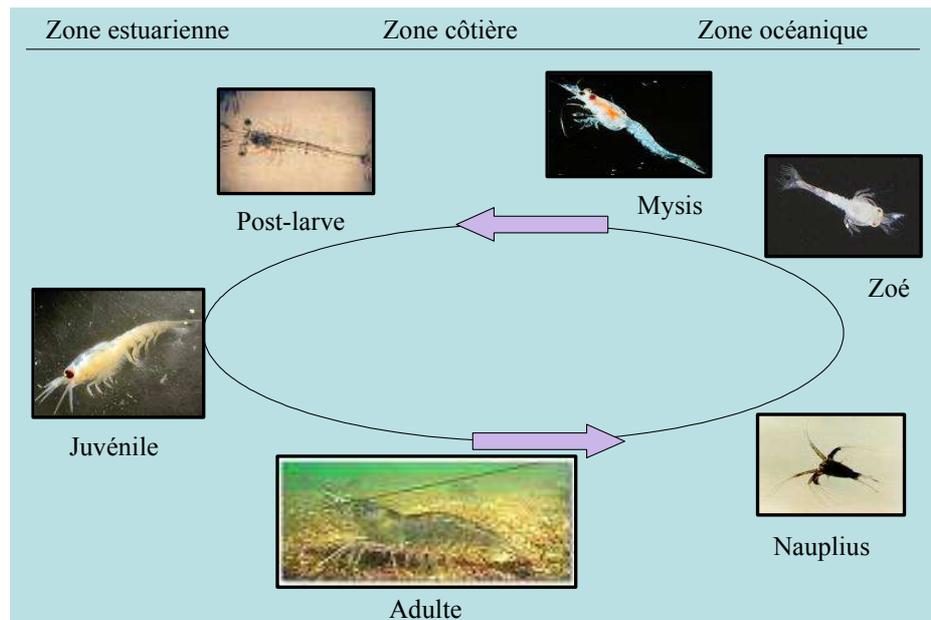


Figure 11 : Cycle biologique naturel des crevettes pénéides

## II.2 Reproduction de *L. stylirostris*

La maturité sexuelle est atteinte vers huit mois. L'accouplement s'effectue juste avant la ponte, en période chaude (température voisine de 28-29°C), lorsque la maturation ovarienne est achevée, en étroite relation avec le cycle de mue. Le mâle dépose alors sur la femelle des spermatophores contenant les spermatozoïdes. Une femelle émet environ 100000 à 300000 oeufs pour une même ponte. Le développement embryonnaire aboutira au bout de 18 heures environ au premier stade larvaire : le nauplius.

En élevage, les femelles peuvent être stimulées pour induire la maturation ovarienne par une épédonculation, c'est-à-dire une ablation unilatérale du pédoncule oculaire. Chez les crustacés décapodes, ce stress induit un raccourcissement de l'inter-mue et lève l'inhibition du développement de la gonade induite par une hormone accumulée dans la glande endocrine du pédoncule oculaire. Cette épédonculation entraîne donc la reprise et l'accélération de la maturation sexuelle. Elle permet en outre une maturation synchrone des femelles dans tous les bacs et augmente la fréquence des maturations jusqu'à 3 ou 4 par mois au lieu d'une seule. La fécondation se fait par insémination artificielle : les spermatophores sont prélevés par simple pression dorso-ventrale des mâles, le sperme est ensuite extrait également par pression puis déposé sur le réceptacle femelle au niveau de l'avant dernière paire de périopodes au dessus du thelycum.

### II.3 Immunité chez les crevettes et mécanismes de défense (Destoumieux, 1998 ; Bachère *et al.*, 2000)

Contrairement aux vertébrés, le système immunitaire des crustacés se caractérise par une absence de mécanismes de défenses acquis, c'est-à-dire qui serait basé sur une mémoire immunitaire permettant la reconnaissance spécifique d'un agent infectieux préalablement rencontré. La réponse immune des crustacés repose sur des mécanismes complexes mais peu spécifiques, à médiation cellulaire et humorale.

Les effecteurs principaux de l'immunité véhiculés par l'hémolymphe, sont constitués par des cellules immunocompétentes, les hémocytes.

La première étape de la réaction immune des crustacés passe par la reconnaissance de l'agent pathogène via certaines molécules du non-soi, comme par exemple les LPS de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, les  $\beta$ -glucanes et les peptidoglycanes des parois bactériennes. Des molécules liant spécifiquement ces éléments exogènes ont été décrites dans nombre de modèles de crustacés : les lectines par exemple et les agglutinines liant les LPS, possèdent des propriétés d'agglutinations, d'autres molécules liant les  $\beta$ -1,3-glucanes induisant l'activation de cellules immunitaires granuleuses capables à leur tour d'activer la phénoloxydase (proPO).

Les molécules de reconnaissance interagissent avec les hémocytes circulants. La classification établie des hémocytes en reconnaît trois types selon le nombre et la forme des granules : les cellules granuleuses (nombreux granules), les cellules semi-granuleuses (granules plus petits et moins nombreux) et les hyalinocytes (pas de granules). Sur la base de caractères cytochimiques et de morphologie, certaines fonctions ont pu être attribuées à ces différents types hémocytaires : la coagulation associée aux hyalinocytes et la phagocytose ainsi que l'activation du système proPO associées aux cellules granuleuses et semi-granuleuses. Des approches comme la cytométrie en flux, ou l'utilisation de marqueurs moléculaires spécifiques de protéines impliquées dans la réponse immune devraient permettre de préciser la fonction des différents types hémocytaires.

La reconnaissance du non-soi active des systèmes de défense par les hémocytes. Le premier d'entre eux est le système proPO qui s'appuie sur l'action d'une oxydoréductase, la phénoloxydase (PO) (Figure 12). Cette enzyme catalyse l'oxydation du phénol en quinones qui conduisent à la formation de mélanine et de composés intermédiaires bactéricides. Ce phénomène de mélanisation bien connu chez les crustacés lors de blessures ou d'infections, est primordial pour la cicatrisation. La biosynthèse et le stockage du précurseur de la PO, c'est-à-dire la proPO, se déroulent dans les hémocytes.

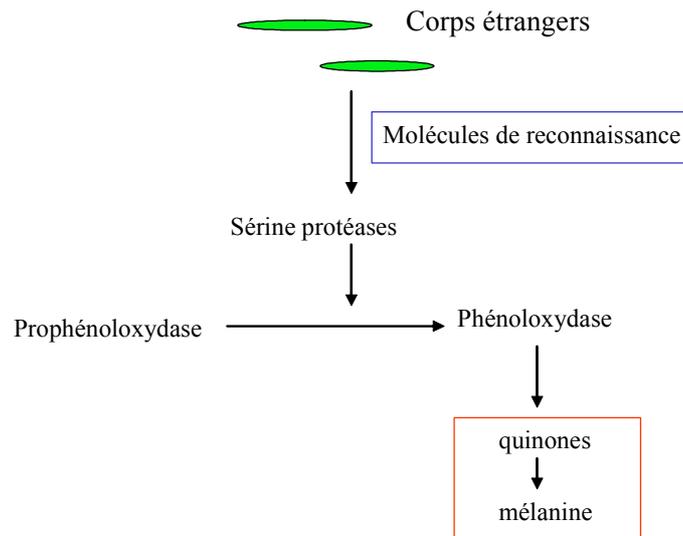


Figure 12 : Représentation schématique du système Prophénoloxydase chez les Arthropodes

La coagulation est un phénomène extrêmement rapide chez les crustacés qui permet de stopper les hémorragies et de limiter la pénétration de micro-organismes. La coagulation consiste en une coagulation plasmatique et une coagulation cellulaire, selon qu'elle implique la formation d'un gel constitué par la polymérisation d'une protéine du plasma, ou d'un agrégat de protéines du lysat hémocytaire.

L'élimination directe d'agents exogènes passe par la phagocytose. Ce processus comprend la reconnaissance de l'agent étranger, son attachement à la surface cellulaire, la formation de pseudopodes, l'internalisation et la fusion phagosomes-lysosomes (organites cytoplasmiques contenant des enzymes lysosomiales : phosphatases acides, estérases,  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase) qui aboutira à la dégradation de la particule phagocytée. Cette dégradation peut aussi passer par une autre voie, le choc respiratoire, faisant intervenir des espèces oxygénées réactives (ROS pour Reactive Oxygen Species). Ce choc consiste en la réduction d'une molécule d'oxygène en anion superoxyde ( $O_2^-$ ) par la NADPH oxydase (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphatase Oxydase). Ces radicaux hautement réactifs, sont microbicides et participent à la destruction de corps étrangers. L'anion superoxyde est converti en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par la superoxyde dismutase (SOD) de façon à protéger de l'effet délétère d'une trop forte concentration en ROS (Bogdan *et al.*, 2000 ; Munoz *et al.*, 2000) (Figure 13).

Dans certains cas, lorsque les particules étrangères sont de trop grande taille ou en trop grand nombre pour pouvoir être éliminées par phagocytose, des nodules peuvent se former correspondant à un agrégat d'hémocytes autour de la particule. S'ensuit la mort des bactéries retenues, cependant le devenir du nodule constitué reste à élucider. Lorsque qu'à cet agrégat cellulaire s'ajoute l'émission d'enzymes lysosomiales à la surface de la particule étrangère, on parle d'encapsulation.

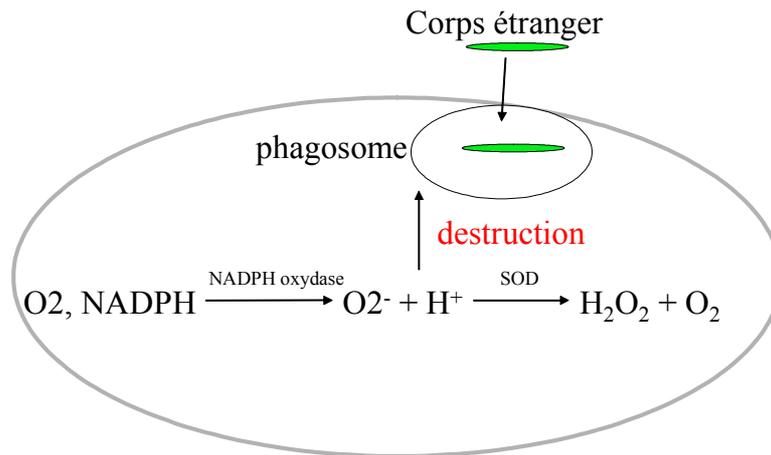


Figure 13 : Représentation schématique du choc respiratoire intervenant après internalisation d'un corps étranger dans le phagocyte

La réponse immunitaire innée des crustacés repose aussi sur la production de peptides antimicrobiens. Les peptides antimicrobiens sont des effecteurs immunitaires extrêmement répandus dans le règne vivant et constituent l'une des premières lignes de défense contre les agents pathogènes. Plus d'un millier de ces molécules ont été décrites à ce jour, dont une majorité chez les insectes. Chez les crevettes pénaïdes, deux types de peptides antimicrobiens ont été décrits : les penaeïdines et des peptides dérivés de l'hémocyanine. Les penaeïdines ont d'abord été décrites chez *L. vannamei* (Destoumieux *et al.*, 2000), puis dans d'autres espèces de crevettes dont deux penaeïdines chez *L. stylirostris* appartenant aux sous-groupes Pen2 et Pen3 mises en évidence dans un contexte d'infection à *V. penaeicida* (Munoz *et al.*, 2004 ; base de donnée sur les penaeïdines Penbase : <http://www.penbase.immunaqua.com>). Les penaeïdines apparaissent jouer un rôle primordial dans la défense immunitaire de ces organismes et ont pu être associées à une inhibition de la sporulation de champignons et à des activités antibactériennes le plus souvent orientées contre les bactéries à Gram positif par des mécanismes d'inhibition ou bactéricides. L'action vis-à-vis des bactéries à Gram négatif, notamment celles appartenant au genre *Vibrio*, n'est pas clairement caractérisée : il s'agirait de mécanismes d'agglutination et d'opsonisation favorisant la phagocytose. Un modèle d'action hypothétique des penaeïdines est présenté en figure 14 (Bachère *et al.*, 2004). Les peptides dérivés de l'hémocyanine constituent un autre groupe de peptides antimicrobiens et dérivent du clivage de l'extrémité C-terminale de l'hémocyanine. Ces peptides ont été mis en évidence dans le plasma de *L. vannamei* et de *L. stylirostris* en réponse à une infection microbienne. L'activité de ces peptides démontrée à ce jour reste strictement antifongique. Cependant, il a été montré qu'en réponse à une infection bactérienne chez la crevette, la concentration en peptides dérivés de l'hémocyanine augmentait clairement (Destoumieux *et al.*, 2001).

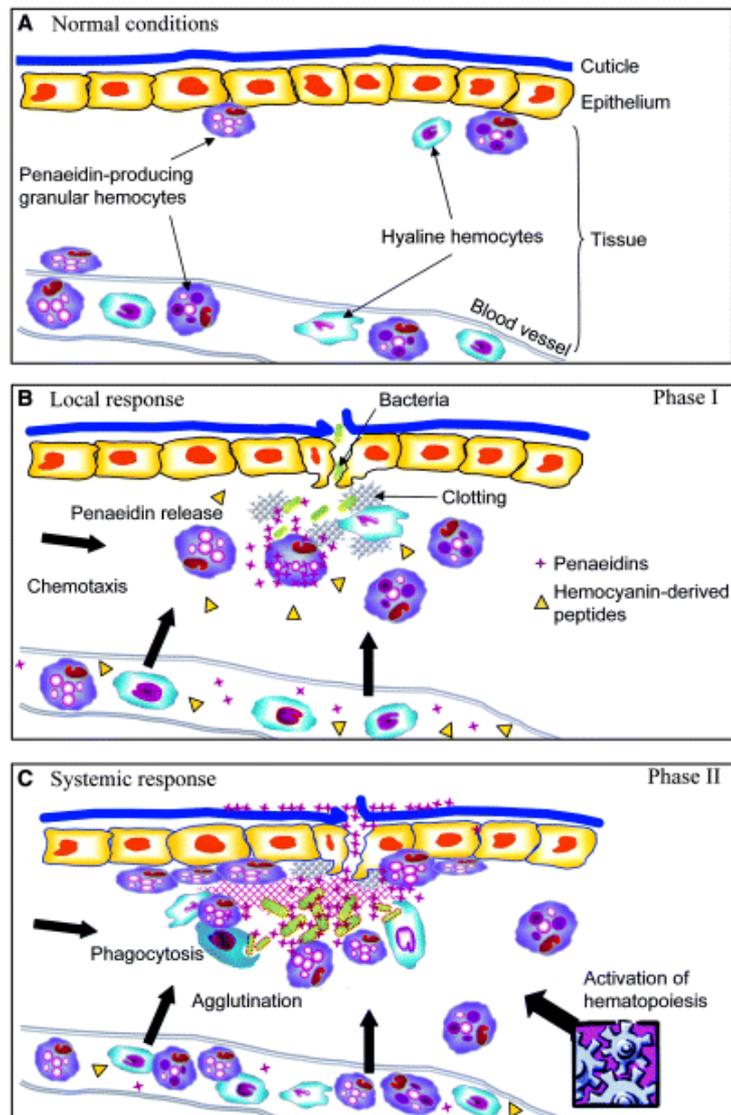


Figure 14 : Modèle d'action des peptides antimicrobiens chez les crevettes pénéides. A) En conditions normales les hémocytes synthétisant les peptides antimicrobiens sont localisés dans les vaisseaux sanguins ou dans les tissus de la crevette. Dans le cas d'une infection bactérienne, deux phases peuvent être distinguées : B) phase I, une réaction locale caractérisée par la migration des hémocytes jusqu'au site de l'infection et par l'émission massive de penaeidines libres dans la circulation ainsi que de peptides dérivés de l'hémocyanine. C) Phase II, une réaction systémique caractérisée par l'accumulation des hémocytes synthétisant les peptides antimicrobiens résultant de l'activation de l'hématopoïèse (Bachère *et al.*, 2004)

Enfin, il a pu être démontré que les crevettes *L. stylirostris* et *L. vannamei* survivantes à une primo-infection à *V. penaeicida* (dose correspondant à la DL50) présentaient une plus grande résistance à une seconde infection dans les 10 jours suivant la première. Ceci suggère l'existence d'une « immunité » protectrice des crevettes survivantes à une infection, qui semblent donc avoir acquis un état réfractaire aux infections itératives, au moins sur un intervalle de temps de courte durée (Saulnier *et al.*, 2004).

## Les bactéries du genre *Vibrio*

### I Taxonomie et caractéristiques générales du genre *Vibrio*

Les bactéries appartenant aux genres *Vibrio* et *Photobacterium* (famille des *Vibrionaceae*) font partie des bactéries les plus anciennement étudiées. *V. cholerae*, l'agent étiologique du cholera fut le premier du genre à être étudié dès 1854 par Filippo Pacini, puis en 1883 par Robert Koch, à qui on attribue communément la découverte du rôle de *V. cholerae* dans la maladie. La caractérisation taxonomique de *Vibrio* était basée jusqu'à la moitié du vingtième siècle sur quelques critères phénotypiques tels que la morphologie des souches (présence de flagelles, incurvation des cellules, aspect des cultures) et le métabolisme des sucres. Ces critères donnèrent lieu à un certain nombre d'erreurs de classification de nouvelles espèces et même de genres.

A la fin des années 1980, les outils d'identification des bactéries appartenant au genre *Vibrio* se sont considérablement améliorés avec l'utilisation de batteries de tests phénotypiques plus adaptés et des analyses en taxonomie numérique reposant sur l'utilisation de différents composés comme source de carbone et d'énergie, l'étude des activités enzymatiques (arginine dihydrolase, gélatinase, chitinase, oxydase, catalase, lysine et ornithine décarboxylases), la tolérance au sel, la luminescence, le préférendum de température, les antibiogrammes et la composition en GC du génome (Alsina and Blanch, 1994). Cependant, en raison de la variabilité génotypique au sein d'une même espèce et de la versatilité phénotypique des souches environnementales, une classification reposant uniquement sur des critères phénotypiques peut poser des problèmes et aboutir à des erreurs de classification taxonomique. Par exemple dans le groupe polyphylétique *V. splendidus*, les outils phénotypiques tels que les galeries API ne permettent pas la distinction des quatre espèces du groupe, *V. kanaloe*, *V. lentus*, *V. chagasii* et *V. pomeroyi* (Le Roux *et al.*, 2004 ; Le Roux et Austin, 2006), de même, les galeries API20E et 20NTF ne permettent pas la distinction de *V. harveyi* par rapport à *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* (Owens et Busico-Salcedo, 2006).

Depuis une vingtaine d'année, le développement d'outils de génotypage moléculaire, a considérablement enrichi les études de taxonomie des procaryotes. Dans un premier temps le séquençage des gènes ribosomiaux (ARNr 5S, 23S et notamment 16S) a permis de remanier la classification des *Vibrio* (Kita-Tsukamoto *et al.*, 1993). Par ailleurs, la très grande proximité des genres *Vibrio* et *Photobacterium* a pu être validée selon cette méthode (Ruimy *et al.*, 1994). Cependant l'analyse de la séquence ARNr 16S trouve ses limites dans la distinction de certaines souches, par exemple au sein du groupe *V. splendidus* (Le Roux *et al.*, 2004), dans la distinction de *Vibrio brasiliensis* et *Vibrio tubiashii*, de *Vibrio coralliilyticus* et *Vibrio neptunius*, ou encore de *Vibrio anguillarum* et *Vibrio ordalii* (Thompson *et al.*, 2004a). L'hybridation quantitative ADN/ADN reste l'outil de référence pour la détermination spécifique d'une nouvelle souche bactérienne par

rapport à la souche de référence la plus proche en phylogénie ARNr 16S. Le seuil admis est de 70% au niveau des hybridations ADN/ADN (Stackebrandt *et al.*, 2002). Aujourd'hui de nombreuses techniques de typage moléculaire plus ou moins discriminantes (Figures 15 et 16) sont disponibles pour des études de taxonomie (Vandamme *et al.*, 1996 ; Thompson *et al.*, 2004a). Les dernières avancées en terme de taxonomie des procaryotes ont montré le pouvoir très discriminant du typage de séquence en multiloci ou MLST (pour MultiLocus Sequence Typing) développé dans cette étude, une méthode de typage simple et relativement facile à mettre en œuvre, basée sur le séquençage de plusieurs gènes de ménage (Maiden *et al.*, 1998 ; Stackebrandt *et al.*, 2002). Aujourd'hui les taxonomistes s'accordent à privilégier une approche polyphasique combinant plusieurs techniques comme l'hybridation ADN/ADN, le séquençage de l'ARNr 16S ou la MLST et le phénotypage.

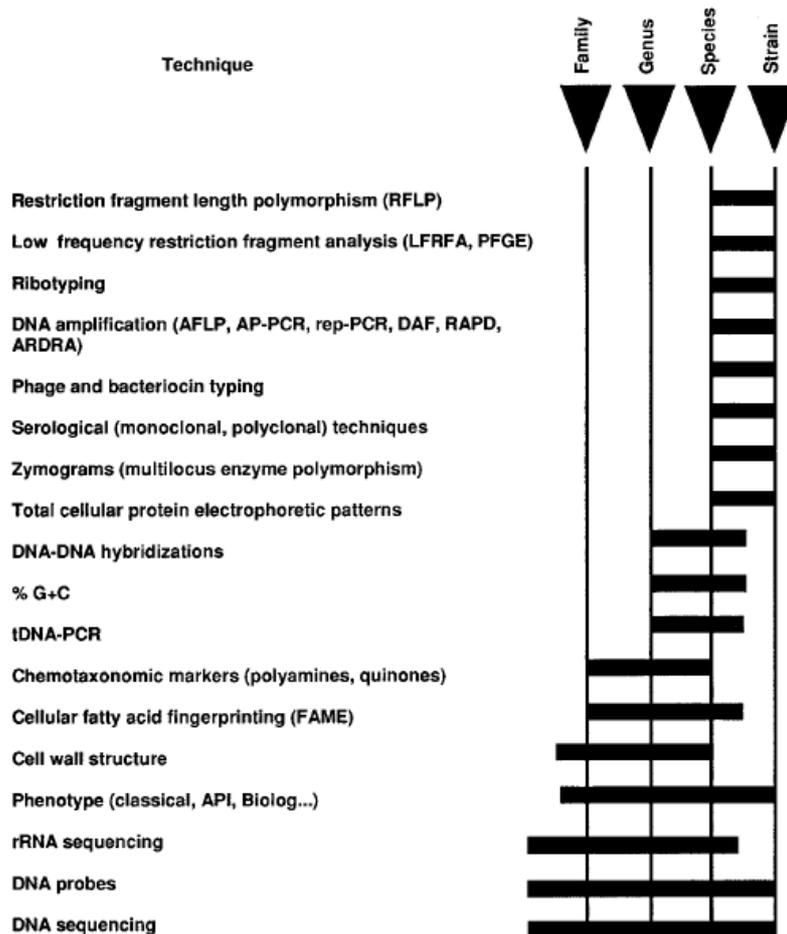


Figure 15 : Résolution taxonomique des outils de typage les plus couramment utilisés (Vandamme *et al.*, 1996)

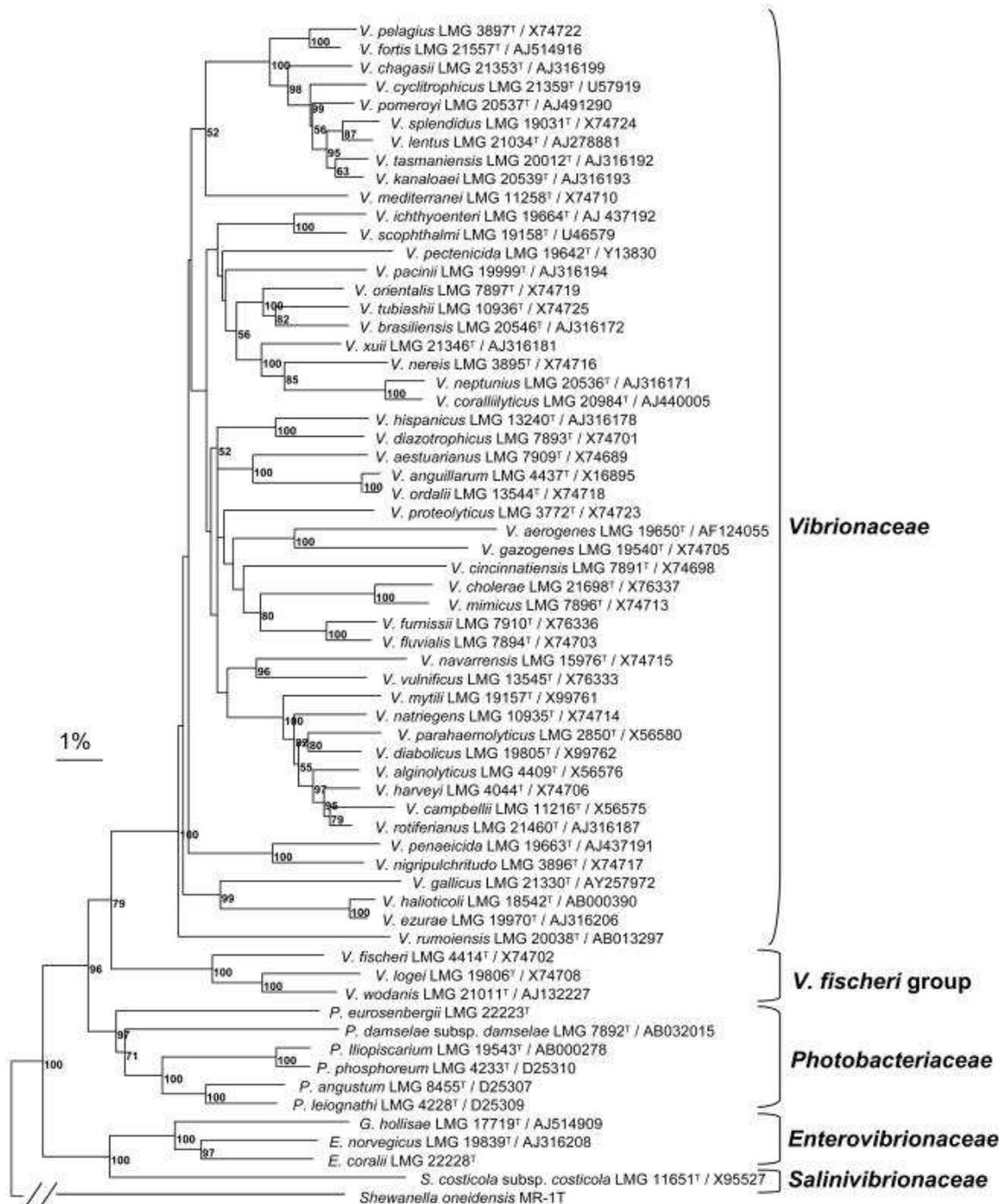


Figure 16 : Arbre phylogénétique en méthode neighbor-joining, sur la base des séquences concatémérisées 16S rRNA, *recA* et *rpoA* (2,898 bp), mettant en évidence différents groupes de *Vibrio* (Thompson *et al.* 2004a)

Les *Vibrio* appartiennent à la classe des  $\gamma$ -*Proteobacteria* et à la famille des *Vibrionaceae*. Le nombre d'espèces décrites ne cesse de croître passant de 20 espèces identifiées en 2002, à plus de 80 en 2007.

Le genre *Vibrio* est un genre essentiellement aquatique et principalement marin. Il regroupe des bactéries à Gram négatif, droites ou incurvées, de 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre sur 1,2 à 3,5  $\mu\text{m}$  de

longueur, non sporulées, aéro-anaérobies, à métabolisme oxydatif et fermentatif, le plus souvent oxydase positive, nitrate réductase positive, produisant souvent de l'acétoïne, chimio-organotrophes, fermentant (le plus souvent sans gaz) le D-glucose, souvent capables de croître dans un milieu minéral contenant du glucose comme unique source de carbone et d'énergie et des ions  $\text{NH}_4^+$  comme unique source d'azote. Les espèces du genre *Vibrio* sont le plus souvent mobiles en milieu liquide grâce à la présence d'un ou de plusieurs flagelles polaires entourés d'une gaine qui est un prolongement de la membrane externe. Elles peuvent présenter de nombreux flagelles latéraux après culture sur des milieux solides. Toutefois certaines espèces sont dépourvues de flagelles et immobiles. La présence d'ions sodium stimule ou est nécessaire à la croissance. Chaque espèce possède un *preferendum* thermique pour sa croissance. Les *Vibrio* poussent généralement sur milieu "marine agar". Une gélose TCBS (Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose agar) a été développée pour l'isolement sélectif de *V. cholerae* et de nombreux autres *Vibrio* peuvent également y être cultivés.

Les génomes de plusieurs espèces de *Vibrio* ont été entièrement séquencés : *V. cholerae* (Heidelberg *et al.*, 2000), *V. parahaemolyticus* (Makino *et al.*, 2003), *V. vulnificus* (Chen *et al.*, 2003) et *V. fischeri* (Ruby *et al.*, 2005), *V. salmonicida* (Haugen *et al.*, 2007). Notre équipe a récemment réalisé le séquençage complet d'une souche de *V. splendidus*, en collaboration avec l'Institut Pasteur. (Le Roux *et al.*, 2007a). L'analyse des génomes complets ainsi que certaines études (Trucksis *et al.*, 1998 ; Yamaichi *et al.*, 1999) par électrophorèse en champs pulsé (PFGE), ont montré l'existence systématique de deux chromosomes circulaires chez les *Vibrionaceae*. Le contenu génétique de ces deux chromosomes est très dissemblable : le chromosome I, généralement de plus grande taille (environ 3 Mb), présente la majorité des gènes impliqués dans la réplication et la réparation de l'ADN, la transcription, la traduction, la biosynthèse de la membrane cellulaire, des gènes impliqués dans des voies centrales cataboliques ou de biosynthèse, ainsi que des gènes de virulence codant des adhésines, la capsule, les lipopolysaccharide, des enzymes hydrolytiques et des toxines ; le chromosome II, généralement de taille plus réduite (entre 1 et 2 Mb), contient une proportion plus élevée (59% chez *V. cholerae*) de gènes codant des protéines hypothétiques (c'est-à-dire dont un gène orthologue a été décrit dans d'autres espèces bactériennes) (Heidelberg *et al.*, 2000). On notera que la souche de référence de *V. nigripulchritudo* possède les deux plus grands chromosomes décrits à ce jour chez les *Vibrio* (Okada *et al.*, 2005). Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer cette partition du génome en deux chromosomes, chez *V. cholerae*. La première hypothèse est celle d'Heidelberg *et al.*, (2000), qui propose l'origine mégaplasmidique du chromosome II, acquis par transfert horizontal par une espèce de *Vibrio* ancestrale ; leur hypothèse s'appuie sur l'analyse phylogénétique du gène *parA* proche de l'origine putative de réplication, sur l'absence d'opérons ribosomiaux, sur la proportion plus faible de gènes codant pour la machinerie cellulaire, sur la présence d'un super-intégron (voir chapitre sur les transferts horizontaux de gènes) (Mazel *et al.*, 1998 ; Rowe-Magnus et Mazel, 2001). La deuxième hypothèse proposée par Waldor et RayChaudury (2000) propose que le chromosome II

résulterait de l'excision d'un chromosome ancestral de grande taille ; leur argumentaire repose sur des pourcentages en G+C très proches pour les deux chromosomes (ce qui pour Heidelberg s'expliquerait d'avantage par une acquisition très ancienne du mégaplasmide) et sur la présence de gènes essentiels au niveau du chromosome II. La question se pose alors de l'origine de cette partition du génome et des conséquences associées : pour Waldor et RayChaudury, la partition pourrait permettre à la bactérie d'achever plus rapidement la duplication de son génome et la division cellulaire, ce qui accentuerait la vitesse de croissance et donc la compétitivité de la bactérie dans un environnement sélectif.

## II Espèces de *Vibrio* pathogènes

### II.1 Espèces de *Vibrio* pathogènes chez l'Homme

Plus de 12 espèces de *Vibrio* ont été décrites comme impliqués dans des infections humaines allant de la simple surinfection de plaie cutanée, otite externe, jusqu'à des septicémies souvent mortelles en passant par des syndromes digestifs (gastro-entérites, iléites,...) parfois graves. Ainsi, des tableaux cliniques variés correspondant à des pathologies diverses peuvent être causés par des infections à *Vibrio*. Toutefois, certaines maladies sont plus fréquemment rencontrées, mieux connues et responsables de complexes pathologiques bien identifiés. Ainsi, les trois principales espèces de *Vibrio* responsables de mortalités conséquentes pour l'homme et posant des problèmes de santé publique sont *V. cholerae*, *V. vulnificus* et *V. parahaemolyticus*. Les infections à *Vibrio* sont liées à une contamination hydrique (eau douce, saumâtre ou marine) ou à l'ingestion d'animaux marins.

#### II.1.1 *Vibrio cholerae*

*V. cholerae* est l'agent étiologique du cholera. Il s'agit d'une infection intestinale sévère caractérisée par une diarrhée aiguë pouvant aboutir sans thérapie de réhydratation adéquate, à une déshydratation mortelle en quelques jours. Le cholera provoquait déjà des mortalités il y a 1000 ans et a causé 7 pandémies depuis 1817, la dernière en date ayant débuté en Indonésie en 1961, s'étendant par la suite en Inde, en Afrique, dans le sud de l'Europe et enfin en Amérique du Sud. En 2005, plus de 130000 cas de cholera avaient été répertoriés dans le monde, dont 2200 mortels, soit une augmentation de 30% par rapport à 2004. L'Afrique représentait 95% de ces cas déclarés. Ces chiffres restent probablement en deçà du nombre réel de cas de cholera car ils ne tiennent compte que des cas déclarés (chiffres de l'Organisation Mondiale de la Santé OMS : <http://www.who.int/wer>).

Les souches de *V. cholerae* décrites présentent des statuts de virulence variables avec l'existence de souches non pathogènes et d'autres hautement pathogènes. La classification des souches de *V. cholerae* se fait à partir de la caractérisation de l'antigène O (un constituant des lipopolysaccharides LPS de la membrane externe) qui présente une grande diversité sérologique

permettant de définir plus de 200 sérogroupes. Certains sérogroupes ont été subdivisés en biotypes, comme par exemple le séro groupe O1 divisé en biotype classique et en biotype El Tor responsable de l'actuelle pandémie. Depuis 1992, un autre séro groupe est apparu au Bengale et au Bangladesh causant des mortalités, il s'agit du séro groupe O139 qui pourrait donner naissance à la huitième pandémie de cholera (Sack *et al.*, 2004). La principale voie de contamination passe par l'ingestion de produits de la mer et par l'eau lorsque les conditions sanitaires ne sont pas satisfaisantes (traitement de l'eau notamment). On compte parmi les réservoirs de *V. cholerae*, des copépodes, des plantes aquatiques, des insectes chironomides et des cyanobactéries (Lipp *et al.*, 2002 ; Islam *et al.*, 2004 ; Halpern *et al.*, 2006). Un modèle des facteurs de risques et des facteurs déclenchant le cholera est présenté en figure 17.

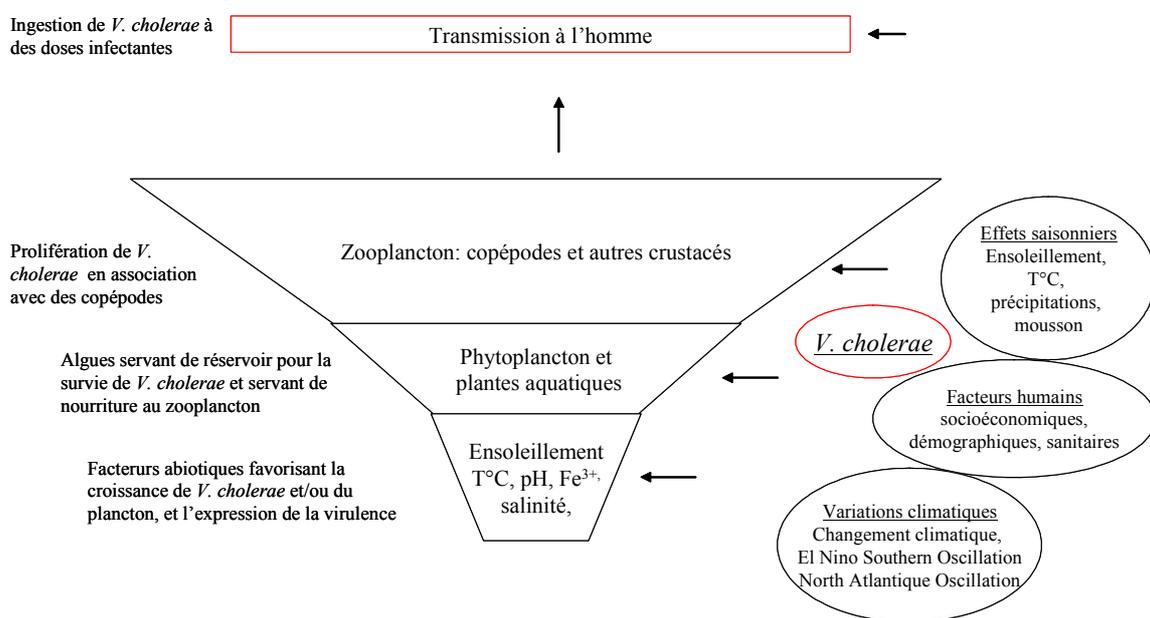


Figure 17 : Modèle des facteurs environnementaux impliqués dans la transmission du cholera (d'après Lipp *et al.*, 2002)

Le degré de virulence très variable dans les différents sérogroupes de *V. cholerae*, ainsi que le potentiel de certains sérogroupes à engendrer une véritable épidémie, va dépendre de la présence d'un certain nombre de facteurs de virulence. Parmi ces facteurs, on distingue les facteurs de virulence dits « majeurs » des facteurs « accessoires ». Les facteurs de virulence « majeurs » sont retrouvés spécifiquement dans les sérogroupes O1 et O139 et apparaissent être principalement responsables du caractère hautement pathogène de ces sérogroupes, capables de provoquer une épidémie. Les facteurs de virulence « accessoires » vont caractériser la variabilité des statuts de virulence des différents sérogroupes de *V. cholerae*, aussi bien O1 et O139, que d'autres sérogroupes responsables localement d'infections plus ou moins graves, mais non létales. Différentes études ont ainsi montré que la délétion de gènes considérés comme codant des effecteurs « majeurs » de la virulence, pouvait tout de même s'accompagner de symptômes résiduels classiquement associés à la maladie et attribuables à d'autres

effecteurs « accessoires » de la virulence (Kaper *et al.*, 1984; Tacket *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1994; Coster *et al.*, 1995).

### II.1.1.1 Facteurs de virulence « majeurs » chez *V. cholerae*

- La toxine cholérique CT (Cholera toxin) de *V. cholerae*

La toxine cholérique CT est une exotoxine, une protéine toxique excrétée dans le milieu extérieur. La toxine CT est codée par le phage filamenteux CTXΦ, intégré au chromosome I de *V. cholerae*. On distingue deux parties dans CTXΦ (Faruque et Mekalanos, 2003): la région RS2 (codant des protéines impliquées dans l'intégration, la réplication et la régulation de CTXΦ) et la partie centrale ou «core», qui porte les gènes *ctxA* et *ctxB* codant les deux modules A (deux domaines A1 et A2) et B de la toxine CT, ainsi que d'autres gènes codant notamment des protéines structurales du phage (Figures 18 et 19).

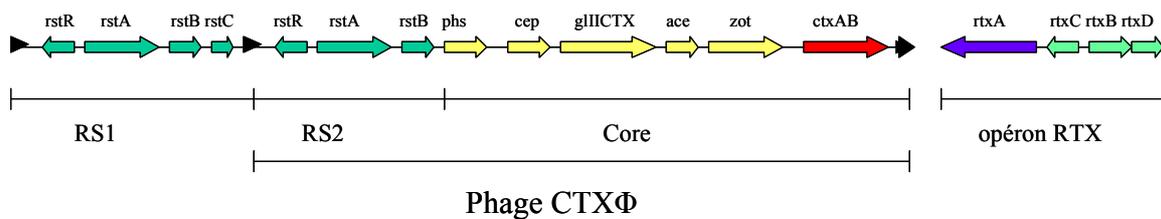


Figure 18 : Structure des phages RS1, CTX et de l'opéron RTX chez *V. cholerae*. Les flèches indiquent le sens de la transcription

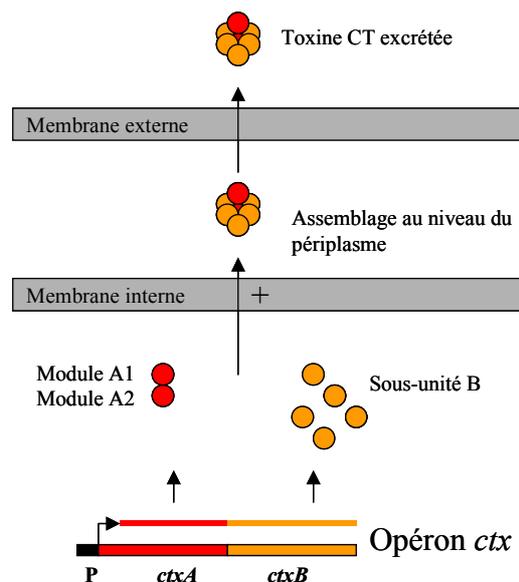


Figure 19 : La toxine cholérique CT, expression, assemblage et excrétion. Les deux sous-unités A et B de CT sont codées par les gènes *ctxA* et *ctxB* localisés dans un même opéron sous contrôle d'un même promoteur (P). Les sous-unités A et B sont excrétées et assemblées dans le périplasme puis excrétées dans le milieu extracellulaire

La sous-unité B de la toxine CT se fixe à un récepteur spécifique, le GM1 ganglioside, présent à la surface des entérocytes (Figure 20). La sous-unité A2 est reliée à la sous-unité B de façon non covalente ; la sous-unité A1 est impliquée dans l'activité enzymatique toxique : elle catalyse l'ADP-ribosylation de la protéine G $\alpha$  qui active l'adénylate cyclase de façon permanente non contrôlée, ce qui a pour effet une augmentation de l'AMPc intracellulaire induisant une perte de contrôle du flux ionique. A l'issue de cette cascade réactionnelle, se produit une perte d'eau par les cellules (principal symptôme du cholera), menant une diminution du volume intravasculaire, à une hypotension, à une hypoperfusion des organes et dans les cas les plus sévères à la mort du patient infecté.

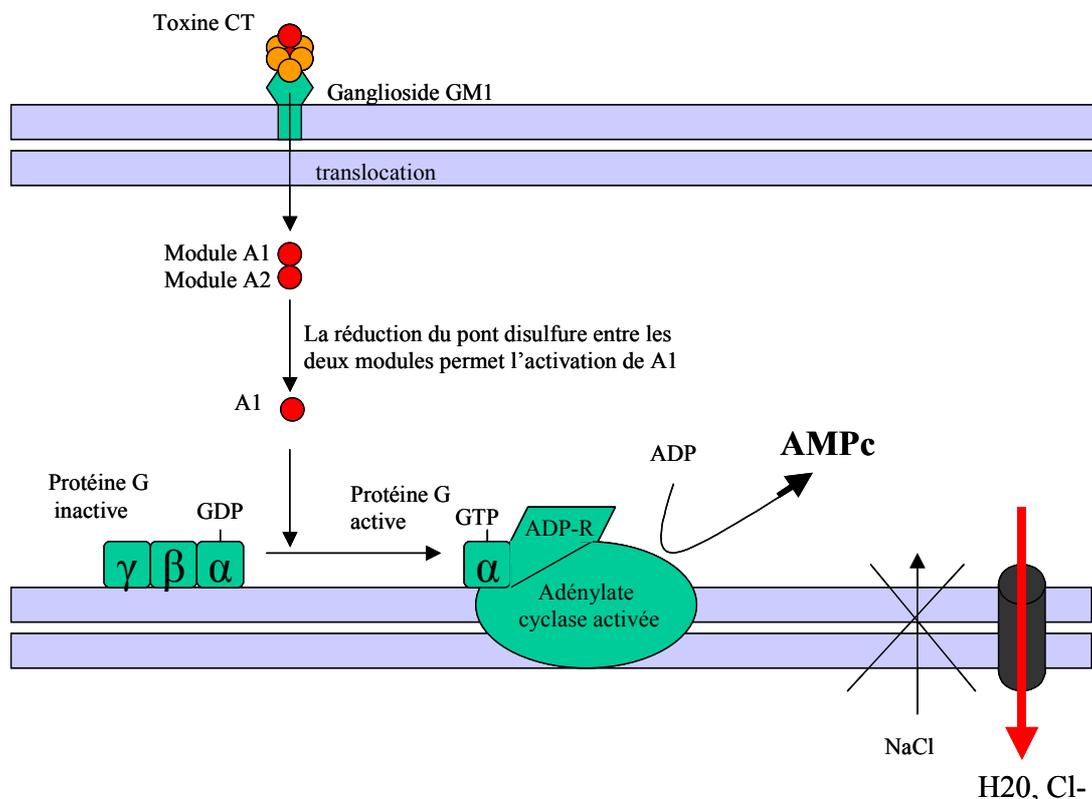


Figure 20 : La toxine cholérique CT, mode d'action. Après fixation au récepteur GM1, la sous-unité A est transloquée dans le cytosol où elle est activée par réduction thiol-dépendante. La sous-unité ainsi tronquée, A1, catalyse l'ADP-ribosylation d'une protéine G. L'activation de l'adénylate cyclase conduit à la libération d'AMPc, messager intracellulaire ubiquiste. L'AMPc inhibe l'absorption active de NaCl et augmente la sécrétion d'eau et d'ions chlorures

- Le Toxin-Coregulated Pilus (TCP) chez *V. cholerae* (Kovach *et al.*, 1996 ; Karaolis *et al.*, 1998 ; Heidelberg *et al.*, 2000)

Le Toxin-Coregulated Pilus (TCP) est un facteur de virulence clé dans le processus infectieux de *V. cholerae* à deux titres : il s'agit d'un pilus de type IV, indispensable à la colonisation du tractus intestinal de l'homme (Tacket *et al.*, 1998) ; par ailleurs, le TCP sert de récepteur au bactériophage

filamenteux CTX $\Phi$ , codant pour la toxine cholérique. La biosynthèse de ce pilus requiert l'activité de quinze gènes regroupés dans l'opéron TCP, localisé sur le chromosome I. Cet opéron fait partie intégrante d'un îlot de pathogénicité appelé VPI (39,5 kpb) caractéristique des souches de *V. cholerae* à l'origine d'épidémies et de pandémies. D'autres éléments sont présents dans le VPI dont un gène *toxT*, qui participe au système de régulation des gènes de virulence chez *V. cholerae* et un opéron (*acfABCD*) codant le facteur accessoire de la colonisation, ACF.

#### II.1.1.2 Facteurs de virulence « accessoires » chez *V. cholerae*

Différents facteurs secondaires ont été décrits chez *V. cholerae*, à la fois dans les sérogroupes O1 et O139, mais également dans les sérogroupes non-O1 et non-O139, responsables d'infections intestinales plus ou moins sévères et du caractère plus ou moins virulent des souches considérées.

- Autre pilus

Le pilus mannose-sensitive hemagglutinin (MSHA) semble également jouer un rôle dans la pathogénèse de *V. cholerae* O1 El Tor (Osek *et al.*, 1992). Par ailleurs, le pilus MSHA peut participer à une voie d'entrée TCP-indépendante du phage CTX $\Phi$  et du phage satellite RS1 (présenté dans le paragraphe V.1) en servant de récepteur au phage filamenteux VGJ $\Phi$  (Campos *et al.*, 2003) : il s'agit d'une nouvelle voie de transduction spécialisée consistant en une co-intégration spécifique de VGJ $\Phi$  avec CTX $\Phi$  ou RS1, sous des formes hybrides nommées respectivement HybP et HybRS. Cette transduction paraît tout aussi efficace que la voie TCP-dépendante.

- Les toxines de la famille RTX chez *V. cholerae*

La plupart des *V. cholerae* O1 El tor et O139 portent des gènes codant une autre toxine qui appartient à la famille des RTX (repeats in toxin) hémolysine et leukotoxine (Lin *et al.*, 1999 ; Fullner *et al.*, 2002). L'opéron *rtx* code pour la toxine RTX (*rtxA*), pour un activateur (*rtxC*) et un transporteur (*rtxB* et *D*) (Figure 18). La production de RTX est associée chez *V. cholerae* O1 El Tor et O139, à un effet cytopathogène lié à un arrondissement des cellules épithéliales humaines par dépolymérisation des filaments d'actine du cytosquelette. Il a été proposé que l'acquisition de l'opéron *rtx* dans ces deux sérogroupes O1 et O139, pourrait avoir participé à leur émergence.

- Toxine cytolysine/hémolysine

*V. cholerae* biotype El Tor, ainsi que la plupart des souches non-O1, produisent une toxine cytolytique sécrétée dans le milieu extérieur : la toxine El Tor cytolysine/hémolysine (Ichinose *et al.*, 1987). Cette toxine présente une activité entérotoxique et apparaît contribuer à la pathogénèse de gastroentérites causées par les souches de *V. cholerae* ne synthétisant pas la toxine cholérique. Cette entérotoxine est codée par le gène *hlyA*, sous forme d'un précurseur prepro-HlyA (de 79 kDa) maturé

en mature-HlyA (de 65 kDa), la cytolysine active. La maturation de cette toxine peut être opérée par différentes protéases types hémagglutinine/protéase, trypsine, subtilisine, thermolysine (Nagamune *et al.*, 1996).

- Les endotoxines ou LPS et la capsule chez *V. cholerae*

Par opposition aux exotoxines, les endotoxines regroupent les composés toxiques structuraux de la paroi des bactéries Gram-négatives, appelés lipopolysaccharides (LPS). Les LPS servent notamment de barrière pour protéger les bactéries des stress extérieurs. La toxicité du LPS survient après avoir été libéré par la lyse cellulaire de la bactérie, provoquée par la réponse immunitaire de l'hôte ou par un traitement antibiotique. Cette toxicité repose sur la capacité du LPS à induire l'apoptose de la cellule hôte (Foster *et al.*, 2000), ou sur une sur-stimulation du système immunitaire entraînant un choc septique.

Trois parties peuvent être distinguées dans la structure du LPS (Reidl et Klose, 2002 ; Caroff et Karibian, 2003) (figure 21) : la partie proximale insérée dans la membrane externe, appelée le lipide A, est responsable de la toxicité du LPS et de ses capacités immunomodulatrices ; la partie centrale, le « core » ou cœur oligosaccharidique intervient dans le maintien de la membrane externe ; la partie distale antigénique O est hydrophile, exposée au milieu extérieur et présente une grande variabilité à l'origine de la spécificité sérologique, permettant la classification d'une espèce bactérienne en différents sérogroupes. Chez *V. cholerae*, deux sérogroupes pathogènes à l'origine d'épidémies ont été mis en évidence : les sérogroupes O1 et O139. Les gènes à l'origine de la synthèse de l'antigène O sont regroupés dans l'opéron *wb*. L'opéron codant O1 est appelé *wbe*, celui codant O139 est différent, il s'agit de *wbf*. En plus de l'antigène O139, *wbf* code également pour une capsule polysaccharidique (Waldor *et al.*, 1994). La capsule est un mécanisme de défense de la bactérie pour résister aux phénomènes de « post-intériorisation » induits par les phagocytes de l'hôte, au cours desquels sont déclenchés des mécanismes immunitaires non spécifiques tels que la production d'espèces oxygénées réactives, d'enzymes lysosomiales ou encore de peptides antimicrobiens. Attridge *et al.* (2001) ont montré que ces LPS ainsi que la capsule connexe étaient également impliqués dans les mécanismes de colonisation.

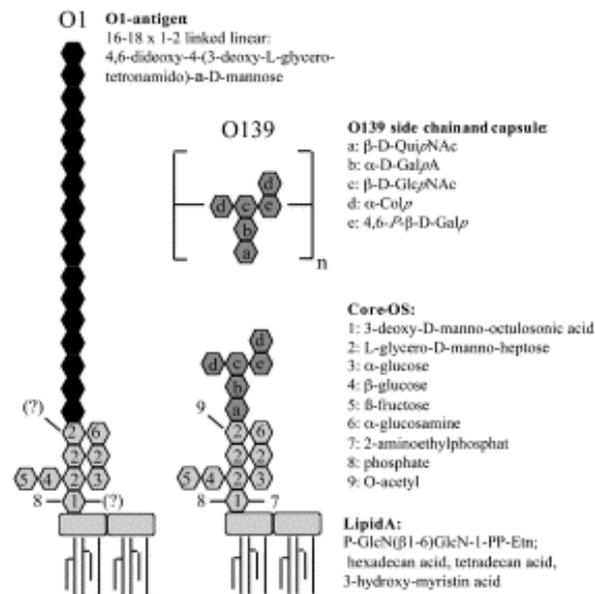


Figure 21 : Structure des LPS et de la capsule des sérogroupes O1 et O139 de *V. cholerae*. Le lipide A et le core sont identiques pour les deux sérogroupes. Les quelques différences chimiques chez O139 sont indiquées par « ? » (Reidl et Klose, 2002)

- Le biofilm bactérien chez *V. cholerae*

Le biofilm se définit comme une population de bactéries adhérant à une surface et enrobée d'une matrice d'exopolysaccharides (EPS). La première étape de la formation du biofilm passe par la synthèse d'EPS qui apportera plasticité au biofilm, résistance aux agents antimicrobiens, à la phagocytose, aux espèces oxygénées réactives et à des conditions nutritives limitantes. Chez *V. cholerae*, il a été montré que le flagelle agissait comme un capteur mécanosenseur contrôlant la synthèse d'EPS : Lauriano *et al.*, (2004) ont montré qu'un mutant non flagellé produisait des EPS de façon non contrôlée et présentait *in vivo* une capacité de colonisation réduite, mais également une diminution significative de la toxine CT et de TCP *in vitro*. Il semblerait donc que la régulation du biofilm chez *V. cholerae* participe activement à la pathogénèse.

### II.1.2 *Vibrio vulnificus*

*V. vulnificus* est un agent infectieux pour l'Homme, transmis par la consommation de fruits de mer contaminés ou par contact d'une blessure avec de l'eau de mer et pouvant aboutir dans les cas les plus aigus à des blessures graves, ou une septicémie mortelle dans 65-75 % des cas, parfois en moins de 24 h. Certains cas de gastroentérites ont par ailleurs été associés à ce pathogène. On compte quelques centaines de morts tous les ans causés par *V. vulnificus*, un peu partout dans le monde.

Trois biotypes ont été décrits sur la base des LPS, de la capsule et plus récemment sur des analyses génétiques. Le biotype I est le principal pathogène pour l'Homme ; le biotype II (reclassé en

sérogroupe E puisqu'un seul type de LPS a été identifié pour ces souches) concerne essentiellement des infections chez l'anguille, mais certains cas d'infections associés à ce biotype ont été décrits chez l'Homme ; enfin, le biotype III a été identifié dans quelques cas de maladie infectieuse chez l'homme (Gulig *et al.*, 2005). Au sein de chaque biotype ainsi caractérisé, on retrouve des souches au pouvoir hautement pathogène et non pathogène. Le typage du biotype I se faisait principalement sur la base de 5 types de LPS, mais il s'est avéré qu'un certain nombre de souches (39 à 49%) ne pouvaient être typées par cette approche, du fait d'une grande hétérogénéité antigénique de ces souches. Depuis, d'autres approches basées sur le typage antigénique de la capsule, sur du ribotypage, des profils PFGE, d'ARNr16S et de PCR-RFLP ont abouti aux mêmes conclusions, à savoir le caractère extrêmement polymorphe des souches de *V. vulnificus* et l'impossibilité d'associer systématiquement et de façon précise, un statut de virulence donné à un groupe phylogénétique ou à un biotype particulier. Ces différents pathotypes de *V. vulnificus* doivent donc être caractérisés sur la base du contenu en facteurs de virulence, certains étant « majeurs », d'autres « accessoires ».

#### II.1.2.1 Facteurs de virulence « majeurs »

On retrouve trois principaux facteurs de virulence chez *V. vulnificus* : la capsule polysaccharidique, l'endotoxine LPS et l'exotoxine hémolysine/cytolysine.

- La capsule polysaccharidique (CPS) de *V. vulnificus*

On l'a vu pour *V. cholerae* O139, la capsule est un mécanisme de défense de la bactérie pour résister aux phénomènes de « post-intériorisation » induits par les phagocytes de l'hôte. La capsule constitue le déterminant majeur de la virulence chez *V. vulnificus* : une mutation au niveau de l'opéron codant le CPS entraîne une diminution significative de la virulence (Whright *et al.*, 1990) et une sensibilité des mutants à l'activité bactéricide du sérum humain (Shinoda *et al.*, 1987). La variation de phase opaque-translucide, décrites chez les colonies de *V. vulnificus*, a été associée à la présence de la capsule (phénotype opaque) ou à son absence (phénotype translucide). La biosynthèse de la capsule n'est donc en réalité pas constitutive d'une souche, mais serait modulée par la température (la production est accrue à 37°C) ; par ailleurs l'expression du CPS inhiberait la constitution du biofilm bactérien (Joseph and Wright, 2004).

- Les lipopolysaccharides LPS

Alors que le CPS apparaît absolument indispensable pour la résistance de *V. vulnificus* à la phagocytose et donc à l'initiation de l'infection, l'endotoxine LPS semble constituer un des facteurs principaux à l'origine du choc endotoxique caractérisé par les symptômes suivants : œdèmes tissulaires, fièvre, hémorragies et hypotension. L'injection chez le rat de LPS purifiés de *V. vulnificus*

entraîne une sévère diminution de la pression artérielle et du volume sanguin et la mort en 30 à 60 min. (pour revue voir Linkous et Oliver, 1999)

- Hémolysine/cytolysine

L'exotoxine hémolysine/cytolysine peut provoquer également des symptômes caractéristiques de l'infection à *V. vulnificus* : cette toxine purifiée, injectée aux souris, provoque des dommages identiques à ceux rencontrés lors d'infections naturelles, suggérant par là que cette toxine pourrait être responsable de la plupart des dommages décrits (Gray et Kreger, 1987). L'hémolysine entraîne la formation de pores dans la membrane de la cellule cible, qui peuvent provoquer quand il s'agit des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, une vasodilatation et des oedèmes caractéristiques. Cependant, aucune atténuation des ces symptômes n'a pu être associée à l'injection de mutants en stratégie knock-out, pour l'hémolysine/cytolysine dans le modèle animal (Wright et Morris, 1991), bien que d'autres études aient prouvé depuis, l'expression de la toxine au cours de l'infection (Lee *et al.*, 2004).

#### II.1.2.2 Facteurs de virulence « accessoires »

D'autres facteurs apparaissent jouer un rôle plus ou moins accessoire dans l'infection à *V. vulnificus* : il s'agit de la métalloprotéase, du sidérophore vulnibactine, de la toxine RTX, du flagelle.

- L'injection de métalloprotéase purifiée dans la souris provoque une nécrose des tissus du derme (Kothary et Kreger, 1987) et augmente la perméabilité vasculaire et la formation d'oedèmes à ce niveau. Cependant, les différentes études utilisant un mutant dont le gène de la métalloprotéase a été délété, n'ont pas mis en évidence d'atténuation des symptômes associés (pour revue voir Gulig *et al.*, 2005).

- Acquisition du fer : le sidérophore vulnibactine

La valeur sélective d'un agent infectieux, peut être considérablement accrue par sa compétitivité dans l'approvisionnement en un facteur limitant, comme par exemple le fer. Dans l'organisme, l'essentiel du fer disponible se trouve sous forme de complexes avec des protéines telles que la transferrine ou la lactoferrine. Certaines bactéries sont capables de capturer le fer à partir de ces complexes. D'autres espèces bactériennes ont développé un système de captage spécifique leur permettant de récupérer du fer dans le milieu : il s'agit des sidérophores. Les sidérophores sont des molécules de faible poids moléculaire (<1000 Da), qui chélatent l'ion ferrique  $Fe^{3+}$  avec une très grande affinité et qui peuvent aussi l'extraire des protéines porteuses type transferrine. Plus de 500 sidérophores ont été décrits et classés en trois groupes en fonction de la structure chimique du groupe

fonctionnel se liant au fer : hydroxamates, catechols et hydroxycarboxylates (pour revue voir Crosa, 1997).

Chez *V. vulnificus*, un sidérophore particulier a été mis en évidence : la vulnibactine (Okujo *et al.*, 1994). Le rôle essentiel de ce sidérophore dans la virulence a été démontré par l'atténuation du phénotype pathogène chez des mutants ne synthétisant plus la vulnibactine et ne pouvant plus extraire de fer à partir de la transferrine (Litwin *et al.*, 1996) ; de même, une délétion au niveau du récepteur de la vulnibactine *VuuA*, entraîne une diminution de la virulence.

- Nombre d'autres facteurs ont été potentiellement associés à la virulence chez *V. vulnificus* (Oliver, 2006)

Des enzymes extracellulaires ont été mises en évidence et pourraient jouer un rôle dans la pathogénicité des souches de *V. vulnificus* : protéase, mucinase, lipase, chondroïtinase, hyaluronidase, estérase et sulfatase.

La toxine RtxA a été associée à la dépolymérisation et à l'agrégation des filaments d'actine et donc au réarrangement du cytosquelette des cellules épithéliales de l'hôte.

Le flagelle constitue également un facteur de virulence : son rôle dans le processus de mortalité causé par *V. vulnificus* chez la souris et dans l'attachement du pathogène au niveau des cellules épithéliales humaines, a été démontré par la création de mutants présentant des délétions au niveau des gènes *flgC* et *flgE* codant le flagelle.

### II.1.3 *Vibrio parahaemolyticus*

Une morbidité et une mortalité élevées ont été associées à la présence de *V. parahaemolyticus* chez les mollusques bivalves, les crevettes, les crabes, les ormeaux et chez certains poissons. Cependant, le pouvoir pathogène de cette espèce a été principalement étudié chez l'homme. *V. parahaemolyticus* est pour l'essentiel décrit comme étant impliqué dans des infections diarrhéiques associées à la consommation de produits de la mer. L'évolution est généralement bénigne, mais environ 10% des malades sont hospitalisés et le taux de mortalité peut atteindre 2%. *V. parahaemolyticus* est décrit pour la première fois en 1950 à Osaka, lors d'une toxi-infection alimentaire collective (TIAC), due à la consommation d'anchois japonais (*Engraulis japonica*). Sur 272 patients atteints de gastroentérite, 20 devaient décéder. Ces TIAC ont été décrites sur les cinq continents. Au Japon elles représentent environ 70 % des gastro-entérites survenant durant les mois d'été (summer diarrhea), dans les autres pays, l'incidence est plus faible (environ 2 à 36 % des TIAC).

La classification de *V. parahaemolyticus* se fait sur la base du sérotypage mettant en évidence 13 sérogroupes de type O et 71 sérogroupes de type K (en rapport avec les propriétés antigéniques de la capsule). Plusieurs sérogroupes sont connus pour induire des infections. En février 1996, un nombre de cas anormalement élevé a été noté chez des individus hospitalisés à Calcutta. Une analyse des

souches a révélé la présence d'un clone particulier appartenant au sérotype O3:K6. Ultérieurement, d'autres clones, aptes à provoquer des pandémies et appartenant aux sérotypes O1:K25, O1:K41, O4:K12, O4:K68, O6:K18 et O1:KUT (UT pour untypable) ont été identifiés. Les analyses génétiques telles que le ribotypage, l'AP-PCR, l'électrophorèse en champ pulsé, le séquençage du gène *toxR*, ou encore les analyses PCR-RFLP sur le gène codant l'hémolysine TDH (Thermostable Direct Hemolysin) ont considérablement fait progresser les connaissances en matière de phylogénie moléculaire chez *V. parahaemolyticus* et ont par exemple montré que ces clones dérivent tous du clone O3:K6 (Bag *et al.*, 1999 ; Yamaichi *et al.*, 1999 ; Makino *et al.*, 2003).

A l'instar des deux espèces précédentes de *Vibrio* pathogènes pour l'homme, *V. parahemolyticus* présente des facteurs de virulence clairement indispensables à la pleine expression de la pathogénicité : les hémolysines TDH et TRH, ainsi que des systèmes de sécrétions de type III ; les autres facteurs « accessoires » pouvant expliquer les différents niveaux de virulence rencontrés chez cette espèce, n'ont été que peu étudiés (pour revue voir Iida *et al.*, 2006).

- Activités hémolytiques : la Thermostable Direct Hemolysin (TDH) et la TDH-Related Hemolysin (TRH)

La TDH constitue l'un des éléments clés de la virulence de *V. parahaemolyticus*, au travers de différentes actions : la lyse des cellules sanguines et une cytotoxicité pour les cellules de l'intestin, entraînant les diarrhées symptomatiques. Le gène codant la TRH présente 67% d'homologie de séquence avec le gène codant la TDH et cette toxine possède les mêmes propriétés entérotoxiques. Des études portant sur la distribution de ces toxines dans des isolats cliniques et environnementaux, ont montré la présence presque systématique de la TDH et de la TRH dans les souches de *V. parahaemolyticus* issues de patients affectés, alors que leur présence dans des isolats environnementaux n'a été montrée qu'occasionnellement et toujours chez des souches s'avérant par la suite virulentes.

- Le système de sécrétion de type III (TTSS)

Le TTSS est un système permettant la sécrétion et la translocation de facteurs de virulence dans le cytosol des cellules eucaryotes cibles (Hueck, 1998) (Figure 22). Le séquençage complet du génome de la souche RIMD2216033 de *V. parahaemolyticus* (Makino *et al.*, 2003) a permis de mettre en évidence deux opérons codants des TTSS, un sur chaque chromosome. Le premier TTSS localisé sur le chromosome I (TTSSI) est constitué de 30 ORFs organisés en opéron : 13 ORFs sont proches de ceux codant le TTSS de *Yersinia* spp., alors que 12 autres ORFs putatifs ne sont retrouvés chez aucune autre espèce de bactérie. Un autre groupe de gènes codant un TTSS a été identifié au niveau du chromosome II (TTSSII), dans un îlot de pathogénicité (PAI), à proximité des gènes codant la TDH. Les études portant sur le rôle de chaque TTSS dans la pathogénicité de *V. parahaemolyticus*, ont montré que le TTSSI est impliqué dans l'effet cytotoxique sur cellules HeLa et que TTSSII possède

une activité entérotoxique chez la souris. Par ailleurs le fait que le TTSSII n'ait été identifié que chez des souches pathogènes pour l'homme, mais jamais à partir d'isolats environnementaux, soutient l'hypothèse d'une véritable toxicité au cours de l'infection. Par contre TTSSI étant retrouvé chez toutes les souches de *V. parahaemolyticus*, quel que soit le statut de virulence, se pose alors la question de son impact réel dans la virulence vis-à-vis de l'homme.

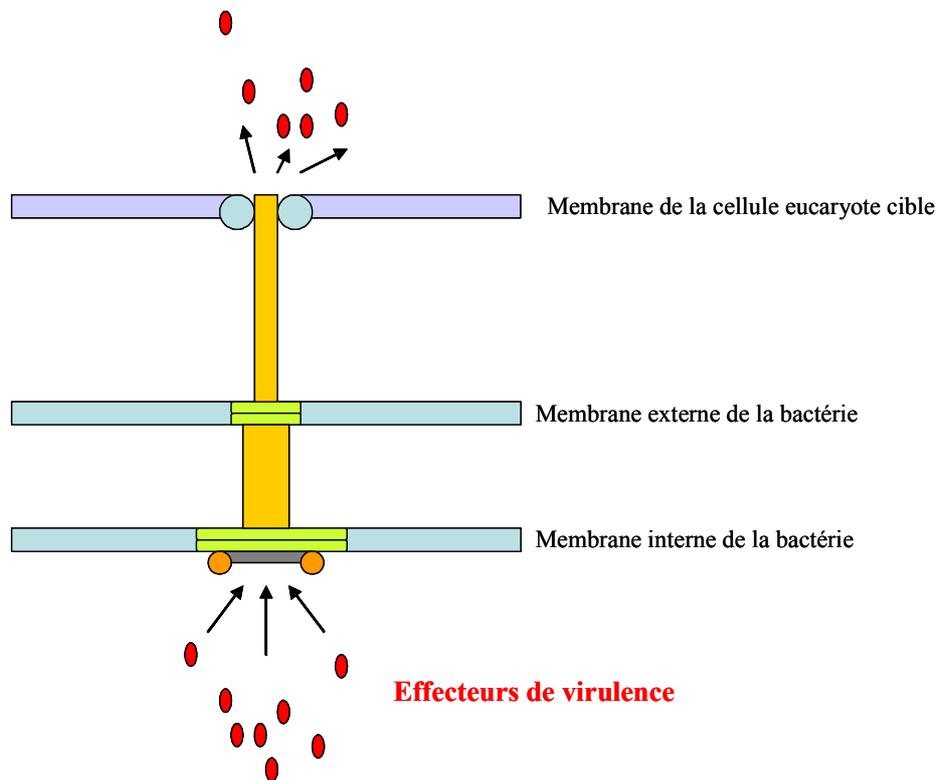


Figure 22 : Représentation schématique du système de sécrétion de type III (TTSS) (d'après Hueck, 1998)

## II.2 Espèces de *Vibrio* pathogènes chez les poissons

Aujourd'hui, chez les poissons, 17 espèces de *Vibrio* sont potentiellement impliquées dans des épisodes de mortalité (Buller, 2004), dont les plus étudiées posent d'importants problèmes en aquaculture : *V. anguillarum* et *V. salmonicida*.

### II.2.1 *Vibrio anguillarum*

*V. anguillarum* est un agent infectieux tout d'abord décrit chez l'anguille en 1909 en Mer Baltique, puis chez une cinquantaine d'espèces de poissons de l'Atlantique et du Pacifique et responsable aujourd'hui des mortalités les plus importantes imputées à une espèce de *Vibrio*, chez les poissons en général et les salomonidés en particulier. Ce pathogène pose aujourd'hui de réels problèmes en aquaculture. Les principales affections provoquées par *V. anguillarum* sont une septicémie hémorragique, une nécrose du cœur, des reins et de la rate, ainsi qu'une atteinte au niveau

des yeux et de l'intestin. Cependant, la vitesse de l'infection peut être si rapide dans les cas les plus sévères, qu'aucun symptôme n'est observé avant la mort de l'animal.

La classification de *V. anguillarum* se fait sur la base du sérotypage mettant en évidence 23 sérogroupes de type O (O1 à O23) (Pedersen *et al.*, 1999). Les souches appartenant au séro groupe O1 sont les plus pathogènes pour les poissons en général, alors que les souches classées dans le séro groupe O2 sont plus fréquemment associées aux mortalités de l'anguille. Enfin, si les souches de type O3 sont très communément isolées du milieu marin, elles ne sont que rarement associées à des épisodes de mortalités. Outre l'utilisation d'un panel d'outils de typage moléculaire (ARNr16S, PCR multiplexe, ADN micro-array etc...), le typage des souches de *V. anguillarum* peut également se faire sur la base des profils plasmidiques et des profils de restriction RFLP des plasmides isolés (Pedersen *et al.*, 1996).

Différents facteurs de virulence ont été décrits chez *V. anguillarum* (pour revue voir Crosa *et al.*, 2005), dont un flagelle, des éléments du quorum-sensing, des protéases et un système de biosynthèse et de transport d'un sidérophore, l'anguibactine.

*V. anguillarum*, capte le fer grâce à ce sidérophore anguibactine, qui constitue un élément majeur de la virulence de ce *Vibrio* (Crosa, 1977 et 1980 ; Actis *et al.*, 1986). L'anguibactine est codée par deux gènes *angR* et *angT* localisés sur le plasmide pJM1 (65 kpb) de *V. anguillarum* 775. Ce plasmide porte par ailleurs l'opéron ITB (pour Iron Transport Biosynthesis) codant un complexe de protéines de transport (complexe FatABCD) permettant l'internalisation de l'anguibactine dans le cytoplasme (Figures 23 et 24, Actis *et al.*, 1995 ; Storck *et al.*, 2002 ; Lopez et Crosa, 2007). La corrélation entre la présence du plasmide pJM1 dans une souche de *V. anguillarum* et sa virulence a été démontrée (pour revue, Crosa, 1997). Pour ce qui est du mécanisme de ce système, l'anguibactine liée à Fe<sup>3+</sup> est reconnue par le récepteur spécifique FatA de la membrane externe et transportée dans le périplasme grâce à un transducteur d'énergie membranaire, le système TonB2 associé au complexe TonB-ExbB-ExbD (Storck *et al.*, 2004). Il se fixe ensuite à une protéine de liaison FatB au niveau du périplasme et enfin au niveau de FatC et de FatD qui constituent une perméase transférant le complexe dans le cytoplasme par un mécanisme ATP-dépendant nécessitant des protéines types ABC (ATP Binding Cassette proteins). Dans le cytoplasme le complexe anguibactine/Fe<sup>3+</sup> se dissocie par digestion partielle ou par un processus réductif.

*V. anguillarum* produit et sécrète par ailleurs des protéases qui pourraient jouer un rôle dans la virulence : une métalloprotéase a par exemple été associée aux capacités d'invasion de la souche NB10 (Milton *et al.*, 1992) ; une autre métalloprotéase proche ou identique, a pu être purifiée de la souche 514 (Farrell et Crosa, 1991).

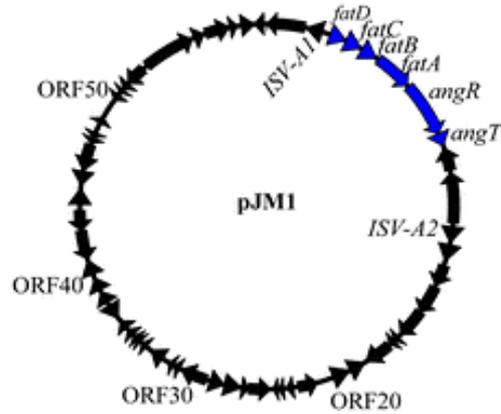


Figure 23 : Carte du plasmide pJM1 de *V. anguillarum* 775. En noir les ORFs hypothétiques, en bleu, l'opéron ITB. L'orientation des ORFs est indiquée par l'orientation des flèches (Lopez et Crosa, 2007)

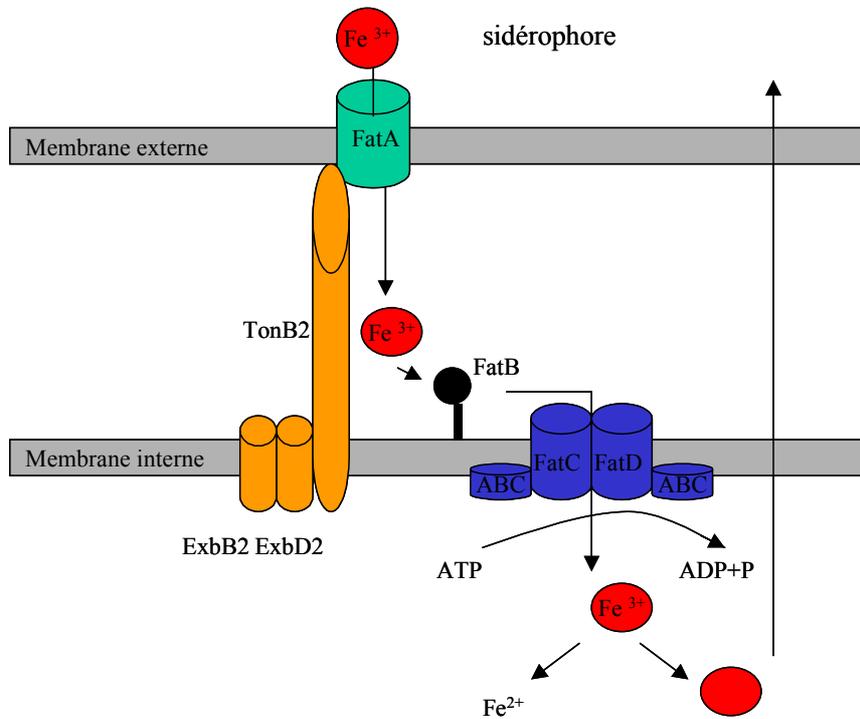


Figure 24 : Transport du fer chez *V. anguillarum* 775 via le sidérophore anguibactine. Le complexe de l'ion  $Fe^{3+}$  chélaté à l'anguibactine est reconnu par le récepteur membranaire FatA et transporté dans le périplasme grâce à un transducteur de liaison (le complexe TonB-ExbB-ExbD). Il se fixe ensuite à la protéine de liaison FatB et pénètre dans le cytoplasme par un mécanisme actif faisant intervenir les perméases FatC et FatD et des transporteurs types ABC (ATP Binding Cassette proteins) (d'après Lopez et Crosa, 2007)

## II.2.2 *Vibrio salmonicida*

*V. salmonicida* est l'agent étiologique de la maladie d'Hitra ou « vibriose des eaux froides », provoquant une septicémie hémorragique qui affecte principalement le saumon (*Salmo salar*) (Egidius

*et al.*, 1986) et dans une moindre mesure la morue (*Gadus morhua*) et quelques autres espèces de poissons. Cette maladie a été décrite pour la première fois en 1977 provoquant des pertes assez conséquentes dans les élevages aquacoles de saumons de Norvège (Egidius *et al.*, 1981).

Deux sérogroupes, C1 et C2, ont été identifiés. Par ailleurs l'étude des profils plasmidiques apparaît pour cette espèce être un autre outil de classification intéressant pour des études épidémiologiques (Sorum *et al.*, 1990), même si aucune corrélation n'a pour le moment été mise en évidence entre ces profils et la virulence des souches bactériennes. Enfin, un sidérophore a pu être caractérisé pour cette espèce comme étant associé à la virulence (Colquhoun et Sorum, 2001).

Le séquençage complet de *V. salmonicida* présenté par Haugen *et al.*, au cours du congrès *Vibrio* 2007, a permis d'apporter de nouvelles informations au niveau des interactions hôte-pathogène et notamment au travers de mécanismes de la motilité, du quorum-sensing, de systèmes type sidérophore et de l'adaptation au stress.

### II.3 Espèces de *Vibrio* pathogènes chez les mollusques

Ces dernières années, la présence de bactéries potentiellement impliquées dans des épisodes de mortalités de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, a fait l'objet de nombreuses études, notamment dans le cadre du programme Morest (MORTalités ESTivales) de l'IFREMER. Plus particulièrement, des épisodes de mortalités estivales ont pu être associés en partie, à la présence d'agents bactériens pathogènes appartenant au genre *Vibrio* : notamment *V. splendidus* et *V. aesturianus* (Le Roux *et al.*, 2002 et 2004 ; Gay *et al.*, 2004a et b ; Garnier *et al.*, 2007)

D'autres espèces de bivalves sont affectées par des vibrioses. On peut retenir pour l'exemple *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. pectenocida*, *V. tapetis* ou encore *V. tubiashii* affectant certaines espèces d'huîtres, de palourdes ou de coquilles Saint-Jacques. Les mollusques gastéropodes peuvent également être affectés par des vibrioses : par exemple, différentes espèces d'ormeaux ont subi des mortalités associées à *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis* ou *V. harveyi* (pour revue voir Labreuche, 2007).

### II.4 Espèces de *Vibrio* pathogènes chez les coraux

Depuis quelques décennies, les phénomènes de blanchiment du corail et d'autres maladies du corail se sont considérablement accrus (Harvell *et al.*, 1999 ; Rosenberg et Ben-Haim, 2002 ; Ward *et al.*, 2004). Les pertes sont estimées depuis 30 ans à 30% (Hughes *et al.*, 2003) et pourraient atteindre 60% d'ici à 2030, en corrélation avec l'augmentation de la température des océans due au phénomène de réchauffement global. Le phénomène du blanchiment du corail correspond à une perturbation de l'association symbiotique entre le corail hôte et les zooxanthelles, microalgues endosymbiotiques photosynthétiques, la couleur blanche du corail affecté correspondant soit à la perte des zooxanthelles, soit à une diminution de la concentration en pigment. Si ce processus ne s'inverse pas en quelques

semaines ou quelques mois selon l'espèce considérée, le corail mourra puisqu'il puise une part de son alimentation des produits de photosynthèse de la zooxanthelle. Le blanchiment entraîne en parallèle une diminution significative de la capacité de reproduction (Szmant et Gassman, 1990). L'étiologie du blanchiment est très variable et pas toujours clairement élucidée. Différents facteurs ont ainsi été incriminés : des facteurs environnementaux tels que la turbidité de l'eau, une augmentation de la température, un trop fort ensoleillement, ou encore une diminution de la salinité ; des maladies d'origine bactérienne ; une combinaison de plusieurs de ces facteurs. Plusieurs espèces de *Vibrio* ont été incriminées dans des phénomènes du blanchiment :

#### II.4.1 *Vibrio shilonii*

*V. shilonii* a été impliqué dans le blanchiment d'*Oculina patagonica* en Méditerranée (pour revue voir Rosenberg et Falkowitz., 2004). Il commence à la fin du printemps, s'accroît en été, atteignant son maximum en septembre, puis le corail récupère son association symbiotique progressivement en automne et hiver.

Les analyses en ARNr16S, ont montré que la souche de référence *V. shilonii* AK1 présentait 99,4% d'homologie avec *V. mediterranei* et les hybridations ADN/ADN s'élevant à 72%, les deux souches appartenaient donc à la même espèce selon les critères de référence en taxonomie (Stackebrandt *et al.*, 2002). Cependant, *V. shilonii* contenant un certain nombre de plasmides absents de *V. mediterranei* (données non publiées), une capacité à utiliser les saccharides, une composition en acides gras et une tolérance au sel différentes (Rosenberg et Koren, 2006), la distinction entre ces deux espèces a été proposée (Kushmaro *et al.*, 2001). Thompson *et al.* (2001) réfutent cette distinction sur la base de leurs résultats en hybridation ADN/ADN de 77%, d'une analyse en AFLP, de la composition en acide gras et de caractéristiques phénotypiques de ces souches. La question de la distinction de *V. shilonii* AK1 et de *V. mediterranei*, n'est toujours pas clairement résolue.

Le blanchiment observé apparaît corrélé avec une élévation de la température en milieu naturel et en infection expérimentale : à 29°C le blanchiment est rapide et complet (50 à 83% de blanchiment en 10 à 20 j à une dose de 100 UFC de *V. shilonii* AK1), à 25°C la vitesse du blanchiment ralentie et le blanchiment reste incomplet, en dessous de 20°C aucun blanchiment n'est observé même à fortes doses du pathogène. La première étape du processus infectieux consiste en l'adhésion de *V. shilonii* au niveau du mucus de la surface du corail, sur un récepteur  $\beta$ -galactoside (Toren *et al.*, 1998). Cette adhésion dépend fortement de la température qui doit rester supérieure à 25°C. Par ailleurs, il a été montré que ce récepteur n'était présent que chez les coraux possédant une activité photosynthétique des zooxanthelles : le pathogène n'adhère donc pas aux coraux déjà blanchis. L'infection du corail par *V. shilonii* fait par ailleurs intervenir une « toxine P » qui s'exprime 10 fois plus à 29°C qu'à 16°C et qui provoque la lyse des zooxanthelles (Ben-Haim *et al.*, 1999), menant *in fine* au blanchiment du corail. La toxine P se lie de façon irréversible avec la membrane du zooxanthelle, formant un canal qui

permet au NH<sub>3</sub> de passer, mais pas aux ions NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, ce qui a pour effet de perturber la régulation du gradient pH et donc de bloquer la photosynthèse.

Plusieurs plasmides ont été mis en évidence dans la souche de référence *V. shilonii* AK1, mais nous ne disposons d'aucun résultat publié ayant cherché à corréler la présence de plasmides à la virulence. Par ailleurs, aucune étude de typage moléculaire sur une collection de souches de *V. shilonii* en Méditerranée n'a été publiée et aucune recherche de différents pathotypes de cette espèce n'a été effectuée. Récemment, l'équipe de Rosenberg a décrit un phénomène de résistance des coraux face à cette maladie, qui pourrait expliquer qu'on ne retrouve plus depuis deux ans ce *Vibrio* sur le terrain et que les infections expérimentales de *O. patagonica* par *V. shilonii* AK1, n'ont pas permis de reproduire les résultats antérieurs de blanchiment (Rosenberg *et al.*, 2007).

#### II.4.2 *V. coralliilyticus*

*V. coralliilyticus* provoque le blanchiment du corail *Pocillopora damicornis* en Mer Rouge et dans l'Océan Indien (Ben-Haim *et al.*, 2003). Le facteur température est également primordial puisque des mortalités ne sont observées en infections expérimentales qu'au-delà de 22°C. L'hypothèse avancée serait que *V. coralliilyticus* prendrait pour cible les zooxanthelles pour des températures allant de 22°C à 26°C ; Une métalloprotéase pourrait jouer un rôle dans la destruction des tissus du corail.

#### II.4.3 *V. alginolyticus* et autres espèces de *Vibrio*

*V. alginolyticus* et différents *Vibrio* spp. non identifiés ont été isolés du corail affecté par la maladie de la Bande Jaune chez *Monastraea* spp. dans la Mer des Caraïbes (Cervino *et al.*, 2004). Les espèces de *Vibrio* incriminés s'attaqueraient aux zooxanthelles plutôt qu'aux polypes du corail et le mécanisme infectieux serait étroitement lié à la température, à l'instar des deux autres maladies du corail précédemment décrites.

#### II.5 Espèces de *Vibrio* pathogènes chez les crustacés

Si les crevettes Pénéides représentent les crustacés chez qui les vibrioses ont le mieux été décrites et étudiées, nombre d'autres crustacés sont touchés par des maladies impliquant des *Vibrio*, comme par exemple le homard *Jasus verreauxi* affecté par *V. harveyi* (Diggles *et al.*, 2000) et *Homarus americanus* affecté par *V. anguillarum* et un *V. fluvialis*-like (Bowser *et al.*, 1981 ; Tall *et al.*, 2003) ; ou les larves nauplii d'*Artemia franciscana* affectées par *V. harveyi* ou *V. proteolyticus* (Soto-Rodriguez *et al.*, 2003 ; Verschuere *et al.*, 2000).

De nombreuses espèces de *Vibrio* affectent les élevages de crevettes : *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. penaeicida*, ou encore *V. damsela* (Lightner,

1998 ; De La Peña *et al.*, 1992 ; Song *et al.* 1993 ; Jiravanichpaisal *et al.*, 1994 ; Ishimaru *et al.*, 1995 ; Lee *et al.*, 1997 ; Alday-sanz *et al.*, 2002 ; Liu *et al.*, 2004 et 1996).

Mais les mortalités les plus importantes restent imputables à *V. harveyi* (Robertson *et al.*, 1998 ; Austin et Zhang., 2006). L'infection à *V. harveyi* se traduit par une anorexie, un retard de croissance et un ralentissement de la nage chez la crevette affectée. Les animaux deviennent opaques, éventuellement luminescents (d'où le nom de "luminescent bacterial disease" parfois donné à la maladie) et ils présentent une dégénérescence tissulaire de l'hépatopancréas (Robertson *et al.*, 1998). De telles infections ont été décrites en Australie, en Équateur, en Inde, en Indonésie, aux Philippines, à Taiwan et en Thaïlande chez *P. monodon*, *L. vannamei* et *M. japonicus*. Si la plupart des souches de *V. harveyi* ne sont pas virulentes, certaines apparaissent extrêmement pathogènes. Certains facteurs de virulence ont été décrits chez *V. harveyi*, mais à ce jour, peu de mécanismes de virulence ont été clairement élucidés :

- Différentes exotoxines ont été mises en évidence chez *V. harveyi* : une cystéine protéase constitue par exemple le facteur de virulence le plus important de souches de *V. harveyi*, impliquées dans les infections de *P. monodon* (Lee *et al.*, 1999a et b ; Liu et Lee, 1999) ; différentes autres exotoxines ont été mises en évidence à partir d'ECP de *V. harveyi*, comme une exotoxine thermostable, une caséinase, une gélatinase, une phospholipase et une lipase (Zhang et Austin, 2000).
- Bactériophages chez *V. harveyi*. Une famille de bactériophages particuliers a été identifiée chez certaines souches de *V. harveyi*. Il s'agit d'un *Myoviridae*, identifié en Australie à partir de la souche virulente 642 et qui a été nommé VHML (*V. harveyi* Myovirus Like) (Oakey et Owens, 2000). Munro *et al.* (2003) ont montré que l'infection de souches naïves non virulentes de *V. harveyi* par VHML, conférait un phénotype virulent à ces souches, probablement en rapport avec une production accrue d'hémolysines. Le rôle exact de ce phage dans la virulence reste à caractériser.
- Un système de quorum sensing a été décrit chez *V. harveyi*. Il s'agit d'un système permettant la communication cellulaire entre bactéries, contrôlée par la densité cellulaire et régulant des fonctions biologiques importantes, comme la sécrétion de facteurs de virulence, la formation de biofilms, la conjugaison ou encore la bioluminescence (Bassler, 1999). Cette « action concertée » ou « quorum sensing », est médiée par des molécules autocrines diffusibles, appelées phéromones ou autoinducteurs. En ce qui concerne *V. harveyi*, deux types distincts d'autoinducteurs ont été décrits : AI-1 et AI-2. L'autoinducteur AI-1 est une homosérine lactone typique des bactéries Gram-négatives et favorise la communication intraspécifique (Cao et Meighen, 1989) ; l'autoinducteur AI-2 est un furanosyl borate diester synthétisé par le gène *luxS* (Chen *et al.*, 2002) et présent dans de nombreuses espèces bactériennes, ce qui suggère l'implication de cet autoinducteur dans la communication interspécifique.

Chacun de ces signaux est reconnu par une kinase particulière (respectivement LuxN et LuxQ). Chez *V. harveyi*, ces deux systèmes de signalisation fonctionnent en parallèle et convergent vers une phosphotransférase (LuxU) qui transmet l'information à une protéine régulatrice LuxO. On notera que ce système de quorum sensing hybride avec deux voies de signalisation en parallèle, a été caractérisé dans plusieurs autres espèces de *Vibrio* : *V. cholerae* (Miller *et al.*, 2002), *V. vulnificus* (Mc Dougal *et al.*, 2001), *V. parahaemolyticus* (Henke et Bassler, 2004) et *V. anguillarum* (Croxatto *et al.*, 2004).

### III La notion de virulence chez les bactéries

Robert Koch, un médecin allemand (1843-1910) a défini un ensemble de postulats à satisfaire pour qu'un microorganisme soit considéré comme l'agent étiologique d'une maladie : 1) l'agent doit être isolé à partir d'un hôte malade, 2) l'agent doit pouvoir être cultivé en culture pure, 3) l'agent, lorsqu'il est introduit chez un hôte sensible, ou dans un modèle s'en rapprochant, doit induire le développement de la maladie, 3) enfin, il doit être possible de ré-isoler le « même » agent à partir du nouvel hôte ainsi rendu malade. De cette vision largement répandue, ont découlé un certain nombre de définitions qui sont aujourd'hui remises en cause, puisqu'elles se basent principalement sur l'idée forte que l'agent pathogène est seul responsable de l'expression de la maladie, indépendamment de l'hôte, de même qu'elles présupposent que cet organisme doit être cultivable hors de l'hôte. Ainsi initialement le pathogène était défini comme un microbe capable de causer une maladie, le pouvoir pathogène (ou pathogénicité) était la capacité du pathogène à produire une maladie et la virulence faisait référence à la capacité à se multiplier au sein de l'hôte.

Les études basées sur les interactions hôte/pathogène ont abouti à une révision de cette terminologie. Pour Casadevall et Pirofski (1999), un pathogène est capable d'infliger des dommages à l'hôte résultant de l'action directe de l'agent infectieux et/ou d'une réponse immunitaire inefficace de l'hôte. Cette définition tient donc compte de la sensibilité de l'hôte à un agent infectieux. L'étude d'une maladie nécessite alors une approche intégrative, tenant compte à la fois du pathogène et de la physiologie de l'hôte, souvent en interactions avec le milieu extérieur. On notera que d'autres problèmes peuvent être rencontrés dans la recherche de l'étiologie d'une maladie, lorsque des pathogènes différents induisent les mêmes symptômes ou lorsque cette maladie résulte de l'action conjointe de plusieurs pathogènes. Par ailleurs, il existe le cas particulier des maladies toxiques, type tétanos, où la toxine seule peut induire la maladie complète sans germe bactérien cultivable au sein de l'hôte.

Un autre problème à prendre en compte, repose sur l'existence fréquente de plusieurs pathotypes différents, plus ou moins virulents, à l'intérieur même d'une espèce bactérienne, comme on l'a vu pour *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, ou *V. harveyi* par exemple. L'existence de différents pathotypes, parfois ciblant spécifiquement un hôte particulier (exemple des différents biotypes de *V. vulnificus*), peut être mise en relation avec un contenu en facteurs de virulence variable d'une

souche à l'autre. On pourrait ainsi qualifier certains facteurs de virulence « majeurs », indispensables au caractère hautement pathogène d'un isolat bactérien : c'est le cas par exemple de la toxine CT et du TCP pour les souches de *V. cholerae* des sérogroupes O1 et O139 ; du CPS, du LPS et de l'hémolysine/cytolysine de *V. vulnificus* ; de la TDH et du TTSS de *V. parahaemolyticus*. Associées à ces facteurs, on retrouve un panel de facteurs de virulence que l'on pourrait qualifier « d'accessoires » ou de « secondaires », extrêmement variable d'un biotype à l'autre et même d'une souche à l'autre et qui peuvent conférer un degré plus ou moins élevé de virulence : c'est le cas par exemple des toxines RTX et cytolysine/hémolysine et du pilus MSHA de *V. cholerae* ; ou encore du flagelle et du sidérophore vulnibactine chez *V. vulnificus*.

Par ailleurs, la définition même des facteurs de virulence, qu'ils soient dits « majeurs » ou « accessoires », n'est pas non plus évidente. Il faut à la fois tenir compte des facteurs directement impliqués dans le dommage à l'hôte (telles que des exotoxines ou des endotoxines par exemple), mais également des facteurs de colonisation et d'adhérence, des mécanismes de régulation des facteurs de virulence, ainsi que des facteurs conférant un avantage sélectif, tels que les systèmes de résistances aux antibiotiques ou d'échappement au système immunitaire. Enfin, les bactéries ont développé des mécanismes moléculaires de transfert horizontal de gènes, leur permettant d'évoluer pour mieux s'adapter à des niches écologiques variables. Il peut s'agir de mécanismes de recombinaison de fragments d'ADN au niveau de la même cellule ; il peut également s'agir de HGT, qui ont permis à nombre d'espèces bactériennes d'acquérir des facteurs de virulence supplémentaires. Dans la partie suivante seront abordées des notions sur les mécanismes de HGT, notamment l'acquisition de facteurs de virulence par HGT dans le genre *Vibrio*. Le paradigme de *V. cholerae* sera notamment utilisé pour illustrer ces mécanismes.

## Transferts horizontaux de gènes (HGT)

### I Introduction et définition

Compte tenu que les bactéries sont des organismes unicellulaires possédant un génome relativement petit, la variabilité des propriétés métaboliques et des caractéristiques phénotypiques les caractérisant paraît extraordinaire (Dutta et Pan, 2002). A l'intérieur d'un même groupe taxonomique comme celui des bactéries entériques, la diversité phénotypique inter-espèces est réellement remarquable : bien que ces bactéries partagent un grand nombre de traits dénotant une origine ancestrale commune, chaque espèce possède aussi un ensemble de caractères phénotypiques qui lui est propre et définissant une adaptation à une niche écologique particulière (bactéries environnementales, symbiotiques, commensales et pathogènes) (Ochman *et al.*, 2000). Une telle diversité n'a pu être atteinte qu'au travers de génomes extrêmement dynamiques impliquant des mécanismes rapides de délétion, d'acquisition et de réarrangements de l'information génétique. On peut définir ces mécanismes en deux grandes classes :

- Une modification interne de l'information génétique, *via* des mutations ponctuelles du génome et des recombinaisons, transmises verticalement à la descendance. Ces mutations aboutissent à une modification, une inactivation ou une régulation différente de gènes existants, jouant un rôle dans la diversification et la spéciation des bactéries à une très grande échelle évolutive. Cependant ces mécanismes ponctuels n'auraient pas permis à eux seuls d'expliquer la très grande diversité génétique et phénotypique des bactéries, leur permettant de répondre à une nouvelle pression de sélection et à la colonisation de nouvelles niches écologiques. Par exemple, aucun des traits phénotypiques utilisés couramment pour distinguer les deux espèces de bactéries entériques *Escherichia coli* et *Salmonella enterica*, ne peut être attribué à des mutations ponctuelles du génome (Lawrence et Ochman, 1998).
- Un deuxième groupe de mécanismes moléculaires, très longtemps sous-estimé, permet ce « dynamisme » génomique : il s'agit de l'acquisition ou de la perte de gènes ou groupes de gènes par des mécanismes de transfert horizontal de gènes (HGT). Ces mécanismes peuvent entraîner des modifications plus ou moins conséquentes de l'organisation du génome et de fait, peuvent générer de nouveaux phénotypes sur une très courte échelle de temps. La part des HGT dans l'évolution paraît donc primordiale (Lan et Reeves, 1996 ; Doolittle, 1999), d'autant qu'à ce niveau, la barrière interspécifique peut ne pas être un frein (Jain *et al.*, 2002). Plusieurs comparaisons entre génomes ont d'autre part prouvé que certains gènes pouvaient présenter une plus forte identité avec des homologues de génomes distants phylogénétiquement qu'avec des homologues de génomes proches, ou même ne pas être présents du tout dans des génomes proches ; à titre d'exemples Nelson *et al.*, (1999) ont

conclu que 24% du génome de la bactérie hyperthermophile *Thermotoga maritima* ont été obtenus d'*Archaeae* hyperthermophiles ; de même Lawrence et Ochman (1998) ont montré que 18% du génome de *E. coli* K12 avaient été acquis par HGT. L'hypothèse de HGT a par ailleurs été avancée depuis des bactéries jusqu'aux eucaryotes (Doolittle, 1998) et inversement, de cellules eucaryotes à des bactéries, comme par exemple chez les bactéries parasites intracellulaires obligatoires *Rickettsia prowazekii* et *Chlamydia trachomatis* (Wolf *et al.*, 1999) ; cependant ces cas de HGT entre eucaryotes et procaryotes restent hypothétiques, ou tout du moins rares. Le débat sur l'importance des HGT dans l'innovation et l'évolution des génomes reste très ouvert (Kurland, 2000 ; Brown, 2003 ; Kurland *et al.*, 2003). Mais si la part des HGT s'avérait être aussi primordiale que le suggèrent certains auteurs dans l'histoire évolutive des organismes, l'analyse des relations phylogénétiques telle que nous la connaissons pourrait être revisitée de façon à tenir compte de ces HGT dans la classification établie.

Les HGT peuvent donc apparaître comme un puissant moteur de l'évolution et trois conséquences possibles de ces HGT au niveau de la cellule peuvent être distinguées, chacune conférant un avantage adaptatif : les HGT peuvent apporter une résistance à un stress comme par exemple dans les phénomènes de résistances aux antibiotiques, pour lesquels a été démontrée l'acquisition horizontale plutôt qu'une synthèse *de novo* (Davies, 1996) ; ils peuvent coder une protéine dont les propriétés physiques sont plus adaptées à un nouvel environnement que le produit du gène résidant initialement ; enfin, les HGT peuvent conférer à la cellule receveuse une nouvelle voie métabolique absente à l'origine et permettant l'adaptation à une nouvelle niche écologique. Ce dernier aspect est particulièrement intéressant dans un contexte d'émergence de nouveaux pathogènes ou d'accroissement de la virulence d'une bactérie pathogène. De nombreuses études portent actuellement sur le sujet.

## II Mécanismes des HGT

Différentes conditions sont requises pour que le HGT soit effectif : premièrement, l'ADN exogène doit pouvoir rentrer dans la cellule receveuse ; deuxièmement, l'ADN transféré doit soit s'intégrer au génome cible, soit se maintenir dans la cellule fille *via* une répllication autonome ou un système d'addiction ; troisièmement, l'ADN transféré pour être sélectionné doit apporter un avantage sélectif à la cellule receveuse (Figure 25). La première étape peut se faire par trois mécanismes distincts : transformation, transduction et conjugaison.

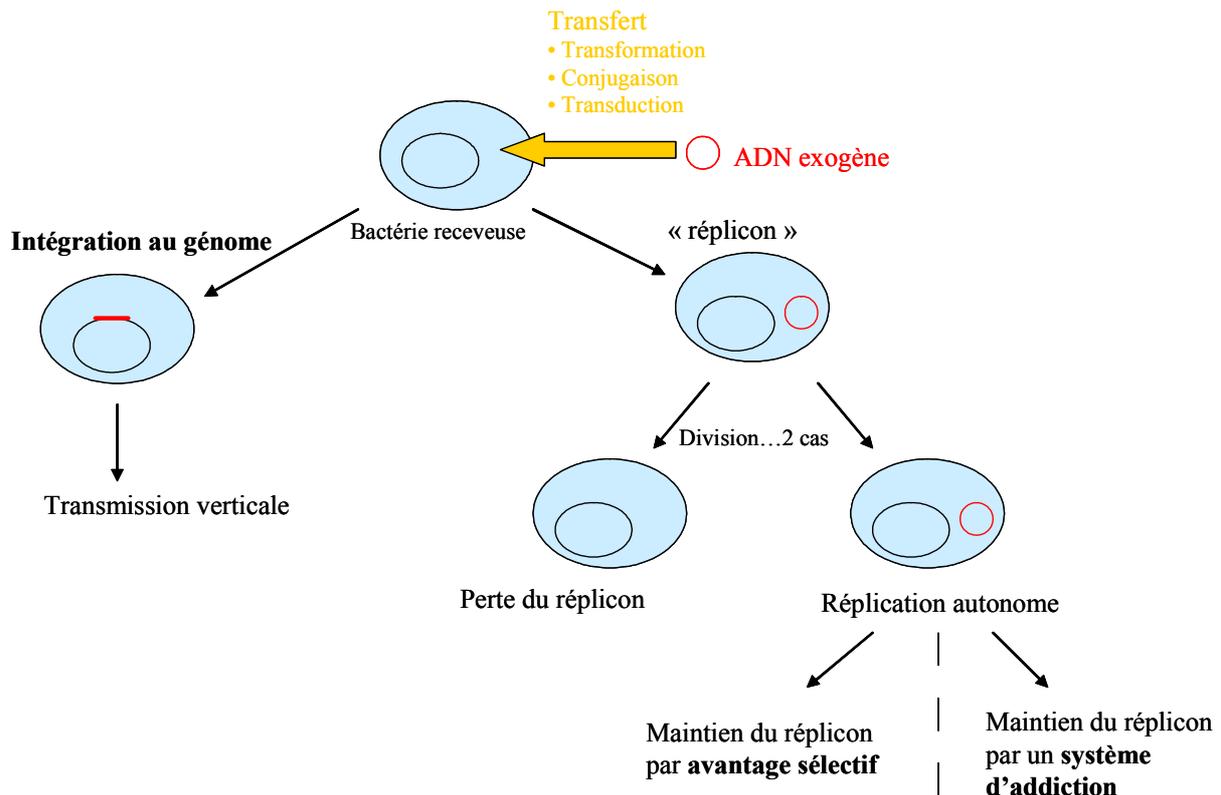


Figure 25 : Représentation schématique des mécanismes de maintien d'ADN exogène transféré dans une bactérie par HGT : intégration au génome, perte du réplicon, maintien sous forme d'un système de réplication autonome par une pression de sélection ou un système d'addiction

## II.1 La transformation

La transformation permet le transfert de matériel génétique sous forme d'ADN nu depuis l'environnement. Certaines espèces de bactéries comme *Neisseria gonorrhoeae* et *Haemophilus influenzae* sont naturellement compétentes à recevoir de l'ADN ; d'autres espèces comme *Bacillus subtilis* et *Streptococcus pneumoniae* deviennent compétentes à certains stades de leur cycle physiologique (Dubnau, 1999). Chez *V. cholerae*, il a été montré que la chitine (le polymère le plus abondant sur terre après la cellulose : cuticules des arthropodes, pelotes fécales, diatomées, champignons) pouvait induire le phénomène de compétence (Barlett et Azam, 2005 ; Meibom *et al.*, 2005) ; la conversion antigénique du sérotype O1 biotype El Tor en sérotype O139, a par exemple été réalisée par un mécanisme de transformation naturelle induit par la chitine (Figure 26) (Blokesch et Schoolnik, 2007).

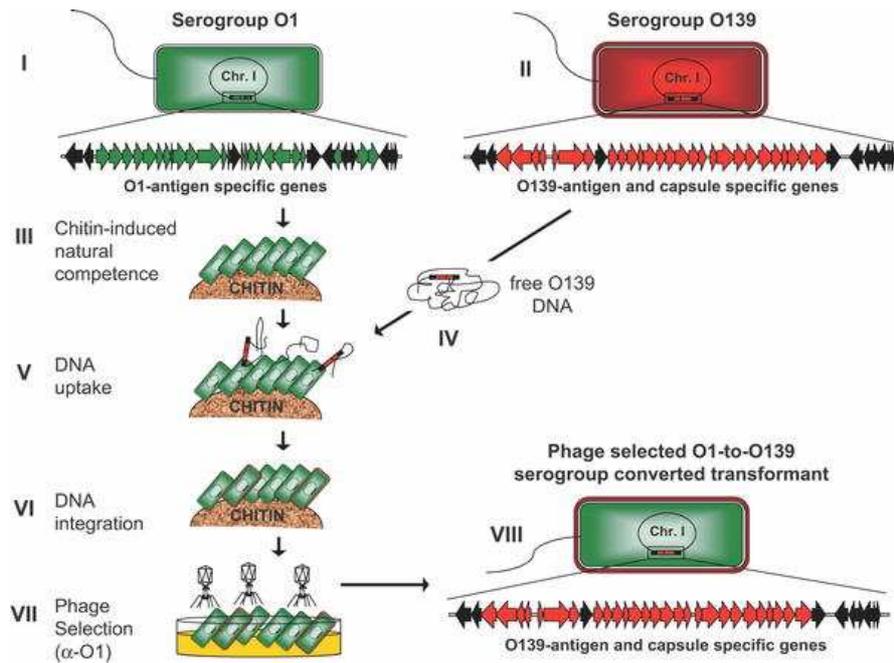


Figure 26 : Représentation schématique de la conversion du sérotype O1 en sérotype O139 par un mécanisme de transformation induit par la chitine. Les souches de *V. cholerae* appartenant aux sérotypes O1 (I) et O139 (II) sont indiquées respectivement en vert et rouge. Les opérons codant les antigènes O1 et O139 ainsi que la capsule de O139 sont indiqués par les flèches ; les flèches noires indiquent les parties communes des opérons. Les cellules de *V. cholerae* O1 poussant sur une surface de chitine deviennent compétentes pour le mécanisme de transformation (III). L'ADN libre de la souche donneuse O139 (IV) pénètre dans les souches O1 (V) et s'intègre au niveau du chromosome par recombinaison homologue (VI). Ce mécanisme conduit à la conversion antigénique O1/O139 : les cellules receveuses transformées produisent l'antigène O139 (VIII) et la capsule associée ; elles deviennent résistantes aux bactériophages spécifiques du sérotype O1 (VII). (Blokesch et Schoolnik, 2007)

## II.2 La transduction (Hendrix *et al.*, 1999)

La transduction correspond à l'infection d'une bactérie par un phage. La quantité d'ADN transféré est conditionnée par la taille de la capsid du phage. Le mécanisme de transduction nécessite la présence de récepteurs reconnus par le phage à la surface de la cellule cible. Une fois transféré, l'ADN phagique peut être intégré au(x) chromosome(s) de l'hôte par des protéines codées par le phage, afin d'être protégé de la dégradation des endonucléases, ou alors se maintenir sous la forme d'un épisome (Figure 25).

## II.3 La conjugaison

La conjugaison consiste en un transfert d'ADN entre une bactérie donneuse et une bactérie receveuse, effectué grâce aux pili suivie de la création d'un pont cytoplasmique permettant le transfert de l'ADN. Ce transfert débute à l'origine de transfert (ou *oriT*) et se déroule selon le modèle du cercle roulant (Figure 27). Un brin d'ADN pénètre dans la bactérie receveuse puis aussi bien chez la bactérie donneuse que chez la bactérie receveuse le brin complémentaire sera synthétisé. On distingue deux

types de plasmides : le plasmide conjugatif (Chen *et al.*, 2003) et le plasmide mobilisable (Hochhut *et al.*, 2000 ; Dunn *et al.*, 2005) :

- Le plasmide conjugatif code notamment pour sa réplication (*oriV*) et au travers de l'opéron *tra*, pour la synthèse de pili, pour des protéines responsables d'une exclusion de surface (empêchant l'attachement de deux bactéries donneuses) et pour le transfert de l'ADN.
- Le plasmide mobilisable contient les origines de transfert et de réplication, mais pas l'ensemble de la machinerie permettant son transfert. Le transfert doit donc être opéré par un élément conjugatif associé.

Une fois dans la cellule receveuse, le plasmide peut soit rester sous la forme d'un plasmide réplcatif, soit s'intégrer au chromosome (Figure 25). Ces mécanismes de conjugaison concernent majoritairement les procaryotes, mais ils existent également entre procaryote et eucaryote comme par exemple entre *Saccharomyces cerevisiae* et *E. coli* (Bates *et al.*, 1998). Dans le genre *Vibrio*, le polymorphisme plasmidique peut permettre de typer des souches de la même espèce par analyse des profils plasmidiques (Thompson *et al.*, 2006), comme c'est le cas par exemple pour *V. anguillarum* (Pedersen *et al.*, 1996). La taille des plasmides est extrêmement variable (entre 0.8 et 290 kpb) et plus de sept plasmides distincts peuvent être retrouvés dans une même bactérie (Hoi *et al.*, 1998).

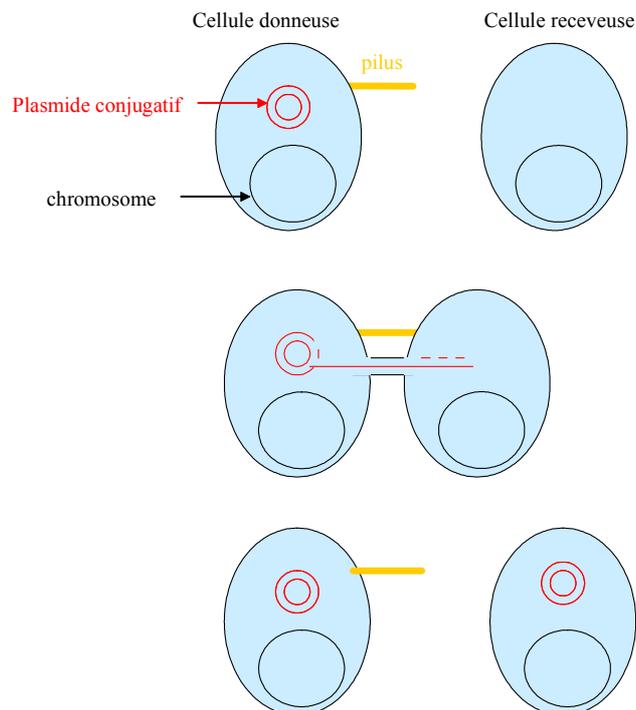


Figure 27 : Représentation schématique de la conjugaison d'un plasmide conjugatif

D'autres éléments mobiles peuvent être transférés par conjugaison : il s'agit des transposons conjugatifs (TCj) qui contrairement aux plasmides n'ont pas de forme réplcatif extra-chromosomique (Beaber *et al.*, 2002). Les TCj sont des éléments transposables de grande taille (16 à

60 kpb) qui codent des protéines requises pour l'excision du TCj et pour la formation d'un pont conjugatif nécessaire à son transfert horizontal par conjugaison.

On notera qu'il existe d'autres éléments transposables capables de mobilité et qui permettent la translocation d'informations génétiques au sein d'un réplicon donné et entre réplicons d'une même cellule. 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 : les éléments d'insertion (IS pour Insertion Sequence), les transposons composites (TC), les transposons non composites (TNC).

#### II.4 Maintien du matériel génétique transféré (Figure 25)

Malgré la diversité des mécanismes d'échanges de matériel génétique, l'introduction d'ADN exogène dans une cellule receveuse ne signifie par pour autant sa stabilité. Différents processus permettent l'installation pérenne d'ADN issu de HGT :

- Il peut s'intégrer au génome par un mécanisme de recombinaison homologue. L'intégration peut se faire par l'intermédiaire de l'intégrase d'un bactériophage ou de la transposase d'un TCj par exemple. Il existe par ailleurs des structures particulières du génome appelées intégrons (Rowe-Magnus et Mazel, 1999 ; Rowe-Magnus *et al.*, 2001), qui sont considérés comme des points chauds de l'intégration d'ADN exogène sous forme de cassettes rendues fonctionnelles une fois intégrées. La structure des intégrons sera décrite page X. Une classe particulière d'intégrons a été mise en évidence : il s'agit du super-intégron qui diffère entre espèces par sa taille et une grande hétérogénéité des sites *attC*. Ces super-intégrons ont été mis en évidence dans plusieurs espèces de *Vibrio*, dont *V. cholerae* représentant pour cette espèce 179 cassettes et 3% du génome (Mazel *et al.*, 1998).
- L'ADN exogène peut également se maintenir sous la forme d'un épisome qui se réplique de manière indépendante des chromosomes.

Dans tous les cas, au moment de la division cellulaire, l'élément exogène intégré ou non, est stabilisé dans la cellule et réparti dans chaque cellule fille, pour deux raisons :

- L'élément génétique exogène peut conférer un avantage adaptatif à la souche receveuse, en réponse à une pression de sélection : il peut s'agir de la résistance à un stress tel qu'un antibiotique, ou de nouvelles voies métaboliques permettant l'adaptation à une nouvelle niche écologique.

- L'élément génétique exogène peut porter un système de mort cellulaire post-ségrégationnelle (PSK pour Post-Segregational Killing, aussi appelés modules d'addiction, ou système toxine-antitoxine) découverts dans les plasmides et certains intégrons et qui assurent leur maintien dans les cellules filles au moment de la division cellulaire (Hayes, 2003). Si au moment de la division le plasmide est perdu, la toxine et l'antitoxine présentes dans le cytosol cessent d'être synthétisées ; la protéine antitoxine instable est rapidement éliminée alors que la toxine, n'étant plus neutralisée, peut exprimer pleinement sa toxicité menant à la mort cellulaire (Figure 28). De ce fait, seules les cellules possédant le plasmide peuvent survivre.

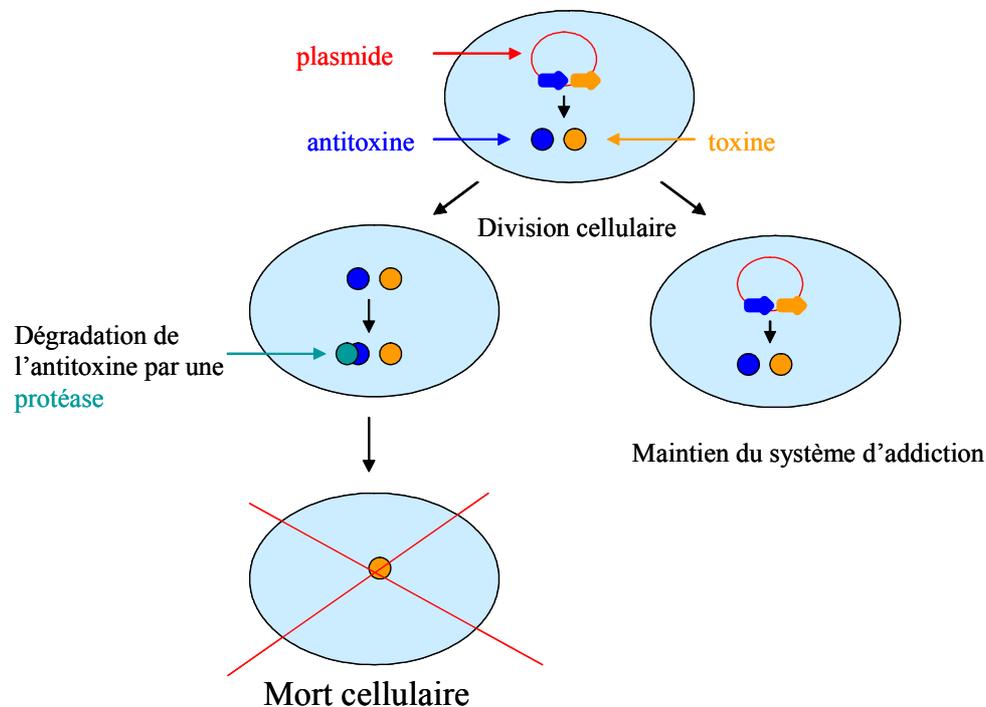


Figure 28 : Représentation schématique du système d'addiction chez les bactéries au niveau plasmidique. La toxine (en orange) et l'antitoxine (en bleu) sont codées par le plasmide. Au moment de la division cellulaire, si le plasmide est absent de la cellule fille, l'antitoxine instable est dégradée rapidement par une protéase (en vert) plus rapidement que la toxine, qui entraîne la mort cellulaire

### III Mise en évidence de HGT

Le caractère transféré par HGT est transmis aux cellules filles, mais absent des autres cellules de la même espèce, conduisant ainsi à une distribution phylogénétique dispersée de ce caractère (Ochman *et al.*, 2000). Cependant certains de ces traits phénotypiques atypiques au sein d'une espèce peuvent avoir comme source un remaniement ne faisant pas intervenir d'élément exogène (recombinaison, mutation) aboutissant au même résultat.

La recherche de caractéristiques atypiques au niveau de la séquence nucléotidique reste le meilleur moyen de faire la différence entre ces deux mécanismes. L'analyse comparée des séquences issues des séquençages complets de génomes bactériens a permis un progrès considérable en ce domaine. L'analyse synténique entre plusieurs génomes peut permettre de mettre en évidence des ruptures de synténie, révélatrices d'évènements de type HGT (Stein *et al.*, 2007). Deux caractéristiques principales au niveau de la séquence de chaque génome sont par ailleurs utilisées pour la recherche de HGT : le contenu en G+C spécifique d'une espèce (Groisman *et al.*, 1993) et l'usage des codons. L'usage des codons correspond à l'utilisation par un organisme d'un codon synonyme préférentiellement à un autre, l'usage du codon n'étant alors pas aléatoire on parle de « biais dans l'usage du codon », variant suivant les espèces (Sharp et Matassi, 1994). En conséquence, une nouvelle séquence d'ADN introduite dans un génome par un mécanisme de HGT retiendra les caractéristiques du contenu en G+C et du biais dans l'usage du codon du génome de la cellule donneuse et se distinguera de fait du reste du génome transmis verticalement (Lawrence et Ochman, 1998). En plus des informations apportées par ce type d'analyse, l'étude des régions adjacentes aux gènes étudiés peut aboutir à la mise en évidence de séquences vestiges de leur intégration, comme par exemple la présence de gènes codant des transposases ou des intégrases. Néanmoins ces analyses comparées de génomes peuvent sous-estimer le nombre de HGT ayant réellement eu lieu, dans la mesure où ces gènes auraient été transférés entre organismes ayant des contenus en G+C proches ou le même biais dans l'usage du codon et du fait qu'il peut exister une « dilution » de ces deux indicateurs avec le temps par rapport au reste du génome. Il peut se produire par ailleurs une disparition des recombinases non essentielles, ne laissant donc aucune trace d'un HGT antérieur.

Enfin, une approche par hybridation soustractive permet également de mettre en évidence des HGT (Lan et Reeves, 1996). Ce point sera particulièrement développé dans le chapitre II.

#### IV Mécanismes de virulence associés aux HGT

De nombreux facteurs de virulence ont été acquis par des mécanismes de HGT pouvant apporter une adaptation très rapide à une nouvelle niche écologique, une plus grande compétitivité et un accroissement de la virulence d'un pathogène donné. *V. cholerae* constitue un paradigme en matière d'acquisition de gènes de virulence par HGT. Ses deux principaux facteurs de virulence, le pilus TCP et la toxine CT, ont été acquis horizontalement, comme on l'a vu dans le paragraphe II.1.1 de ce chapitre :

- L'opéron TCP codant pour un pilus chez *V. cholerae* O1 et O139, fait parti intégrante d'un îlot de pathogénicité appelé VPI (39.5 kpb) qui présente tous les signes démontrant une acquisition horizontale par HGT (Figure 29): il se caractérise par un faible pourcentage en G+C (35%) par rapport au reste du génome (47%), il comporte des gènes codant potentiellement pour une intégrase (gène *int*) et une recombinase, il est flanqué d'un site d'attachement *att*-like. L'origine phagique du VPI a donc

été établie. Il apparaît que l'acquisition horizontale du VPI ait permis à *V. cholerae* de s'adapter à une nouvelle niche écologique, l'organisme humain, en permettant la colonisation de l'intestin et en apportant une toxicité *via* la reconnaissance du phage CTXΦ par le pilus.

- La toxine CT est codée par le phage filamentueux CTXΦ, intégré au chromosome I de *V. cholerae* O1 et O139. Cette toxine constitue un effecteur essentiel de la virulence, qui entraîne au niveau des entérocytes de l'hôte, une cascade réactionnelle menant à une perte de flux ionique et à la déshydratation massive de l'organisme.
- Chez *V. parahaemolyticus*, le système de sécrétion TTSSII, a été localisé sur le chromosome II, au niveau d'un îlot de pathogénicité (PAI). Cet îlot possède un contenu en G+C de 39,8%, clairement différent du reste du génome (45,4%), suggérant que cette région ait été acquise par un HGT récent. Ce PAI contient par ailleurs deux copies du gène codant l'hémolysine TDH, qui pourraient également avoir été acquis horizontalement.
- Outre ces facteurs de virulence « essentiels », des facteurs « secondaires » peuvent également être acquis par HGT. C'est le cas chez *V. cholerae* de la toxine RTX : Heidelberg *et al.* (2000) ont suggéré que l'opéron *rtx* (physiquement lié au CTXΦ au niveau du chromosome I), aurait également été acquis par un mécanisme de HGT (Figure 18).

## V Régulation de l'expression des facteurs de virulence

On a vu que les bactéries pathogènes pouvaient évoluer dans des environnements radicalement différents selon les étapes de leur cycle biologique. Les souches de *V. cholerae* passeront une partie de leur cycle dans le milieu marin et une fois ingérées par l'homme, elles devront s'adapter à une nouvelle niche écologique agressive, l'intestin, puis le coloniser et enfin exprimer leur toxicité. Cette adaptation permanente passe par l'intégration constante de signaux extérieurs, puis par la modulation de l'expression de gènes au niveau de la quantité d'ARNm ou de protéines par des mécanismes transcriptionnels ou post-transcriptionnels. La maturation des protéines par des modifications covalentes, la méthylation, le clivage, l'export, peut également intervenir.

### V.1 Phage RS1 et l'antirépresseur *rstC* chez *V. cholerae*

Le phage satellite RS1 est situé en tandem avec le phage CTXΦ au niveau du chromosome I des souches de *V. cholerae* O1 El Tor et O139 (Davis *et al.*, 2002). Le génome de RS1 (Figure 18) contient des gènes codant des protéines impliquées dans la répllication (*rstA*), l'intégration (*rstB*) et la régulation de l'expression de gènes (*rstR* et *rstC*), mais ne possède aucun des gènes nécessaires à l'assemblage et à la sécrétion des particules virales (Psh, Cep, pIII<sup>CTX</sup>, Ace et Zot). Ainsi ce phage satellite RS1, ne peut se répliquer de façon autonome mais dépend du phage CTXΦ pour l'assemblage et la sécrétion des particules virales (Faruque *et al.*, 2002). RS1 code l'antirépresseur RstC qui permet la transcription du génome du phage CTXΦ et de sa propre région RS1, en modulant l'activité du

répresseur RstR. L'antirépresseur RstC permet ainsi la transmission des phages CTXΦ et RS1 et l'expression de la toxine cholérique CT contribuant à la virulence de *V. cholerae*.

## V.2 Gène régulateur *toxT* de l'îlot VPI (Figure 29)

La modulation de l'expression des deux facteurs de virulence principaux chez *V. cholerae*, CT et TCP, est coordonnée par un unique système de régulation consistant en trois activateurs transcriptionnels différents (DiRita *et al.*, 1991 ; Hase et Mekalanos, 1998) : ToxR localisé dans le chromosome ancestral, ToxT et TcpP localisés dans le VPI acquis par un HGT. L'activateur transcriptionnel AraC-like ToxT (Higgins *et al.*, 1992) active directement les opérons *ctx* et *tcp* ainsi que d'autres gènes. La transcription de *toxT* est sous le contrôle de ToxR et TcpP. L'expression de CT et TCP via cette cascade réactionnelle complexe est induite dans l'environnement intestinal ; les essais *in vitro* ont montré l'importance de paramètres tels que le pH, l'osmolarité et la température. Cependant les études *in vivo* montrent des contradictions avec les essais *in vitro* et l'ensemble des voies de régulation de CT et TCP n'est pas encore élucidé (Lee *et al.*, 1999).

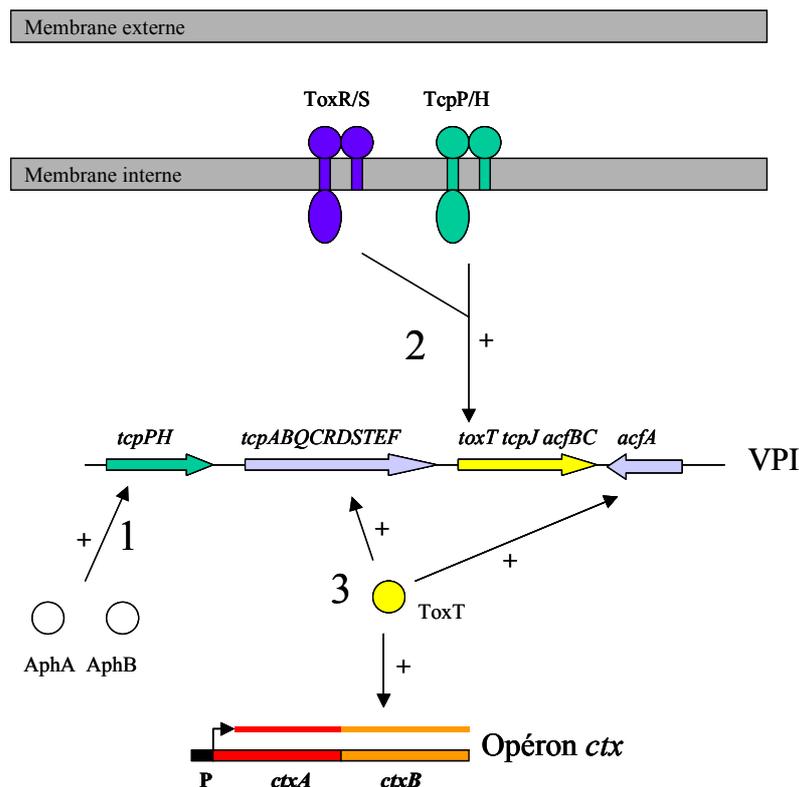


Figure 29 : Cascade de régulation de la transcription de *ctx* et *tcp* chez *V. cholerae*. Induction de l'expression de CT et TCP se déroule en trois étapes : AphA et AphB activent la transcription de *tcpPH* ; TcpPH et ToxRS activent la transcription de *toxT* ; ToxT active la transcription des gènes *tcp*, *ctx* ainsi que des gènes additionnels. Les gènes *tcp*, *toxT* et *acf* sont localisés sur un îlot de pathogénicité acquis horizontalement. Le sens des flèches indique le sens de transcription (d'après Reidl et Klose, 2002)

## VI Mécanismes acquis par HGT conférant un avantage sélectif

### VI.1 Amélioration de l'avantage sélectif par résistance au système immunitaire

Outre son implication directe dans la virulence, le LPS présente des propriétés antigéniques utilisées par l'hôte afin d'assurer sa défense immunitaire. Une modification de l'antigène O a donc pour conséquence directe une perte de reconnaissance de l'agent pathogène et donc une moindre efficacité de la réponse immune. L'émergence de la souche pathogène *V. cholerae* O139 en 1992 résulte du transfert horizontal d'un fragment d'ADN d'origine inconnue dans la région *wbe* de la souche *V. cholerae* O1 El Tor, devenant *wbf*. Certaines études suggèrent que l'émergence du sérotype O139 résulterait d'une délétion de 22 kpb de la région *wbe* puis de son remplacement par 35 kbp de la région *wbf* (Comstock *et al.*, 1996). Pour Yamasaki *et al.* (1999), le sérotype O22 serait à l'origine de ce transfert. L'émergence de ce nouveau sérotype O139, pourrait être à l'origine de la huitième pandémie de cholera. La conversion antigénique apparaît donc souvent liée à un mécanisme de HGT, comme par exemple pour la modification de l'antigène O de *Shigella flexneri* ou de *Salmonella cholerae-suis* associée à un bactériophage (Barrow, 1986 ; Allison et Verma, 2000).

La capsule des bactéries présente également des propriétés antigéniques. A l'instar du LPS, une modification de la capsule entraînera une perte de reconnaissance de l'agent infectieux et donc un accroissement de sa fitness. La modification de l'antigène O139 de *V. cholerae* par un HGT s'est également accompagnée de la production d'une capsule jouant certainement un rôle dans l'émergence de ce nouveau sérotype. D'autres exemples de modification de la capsule lié à un mécanisme de HGT ont été décrits, comme par exemple chez des souches de *Streptococcus* Groupe B (GBS) (Cieslewicz *et al.*, 2005)

Outre l'échappement au système immunitaire de l'hôte par une modification antigénique, une bactérie pathogène peut développer des mécanismes de résistance à la réponse immune, acquis par HGT. C'est le cas par exemple de *S. typhimurium* (Cotter et DiRita, 2000) qui pénètre dans le macrophage grâce aux effecteurs émis par le système de sécrétion de type III codé par le SPI1 (*Salmonella* Pathogenicity Island 1) et qui inhibent ensuite la fusion phagosome-lysosome grâce au produit de *spiC*, un gène localisé au niveau sur le SPI2 (*Salmonella* Pathogenicity Island 2), ces deux îlots de pathogénicité ayant été acquis horizontalement.

### VI.2 Les sidérophores

*V. anguillarum*, capte le fer grâce à un sidérophore, l'anguibactine, qui constitue un élément primordial de la virulence de ce *Vibrio*. L'anguibactine ainsi que le complexe ITB (permettant l'internalisation du sidérophore dans le cytoplasme), sont codés par des gènes localisés sur le plasmide

pJM1 de *V. anguillarum* 775. La corrélation entre la présence du plasmide pJM1 dans une souche de *V. anguillarum* et sa virulence a été démontrée (pour revue, Crosa, 1997).

### VI.3 Résistance aux antibiotiques

#### VI.3.1 *Via* les transposons : exemple du transposon SXT-like de *V. cholerae*

Le transfert horizontal de résistance aux antibiotiques est communément associé à un plasmide : par exemple chez *V. cholerae* O1 El Tor (Falbo *et al.*, 1999). D'autres éléments conjugatifs permettent l'acquisition de cette résistance : chez *V. cholerae*, un transposon conjugatif like appelé SXT a été mis en évidence, tout d'abord dans les souches appartenant au sérotype O139 puis dans l'ensemble des souches cliniques isolées en Inde, Asie et Afrique (Hochhut *et al.*, 2001). Contrairement aux plasmides, le génome du SXT ne contient pas les gènes nécessaires à une répllication autonome et une ségrégation. Néanmoins cette structure possède tous les gènes nécessaires à son excision, sa transmission et son intégration au chromosome. De nombreux ORFs ont été décrits sur les SXT formant une structure mosaïque de phages, de plasmides et de sources inconnues (Beaber *et al.*, 2002).

La résistance à plusieurs antibiotiques (sulfaméthoxazole, triméthoprime, chloramphénicol et streptomycine) a pu être localisée sur le SXT (Waldor *et al.*, 1996), qui constitue donc pour les souches de *V. cholerae* concernées, un avantage sélectif certain.

#### VI.3.2 Les intégrons multirésistants (Rowe-Magnus et Mazel, 1999)

Les intégrons et les super intégrons sont des « hot spot » de la recombinaison à partir de plasmides par exemple, permettant l'intégration de cassettes consécutives par un mécanisme complexe : les cassettes sont des cadres de lecture associés à un site de recombinaison *attC* (Figure 30) qui s'incorporent au niveau du site *attI* de l'intégron via une intégrase (codée par *intI* et son promoteur *Pint*) et seront exprimés par un promoteur fort *Pant* permettant l'intégration. Les intégrons multirésistants sont constitués de cassettes codant plusieurs gènes de résistance à des antibiotiques et confèrent donc un réel avantage sélectif dans un contexte de maladie.

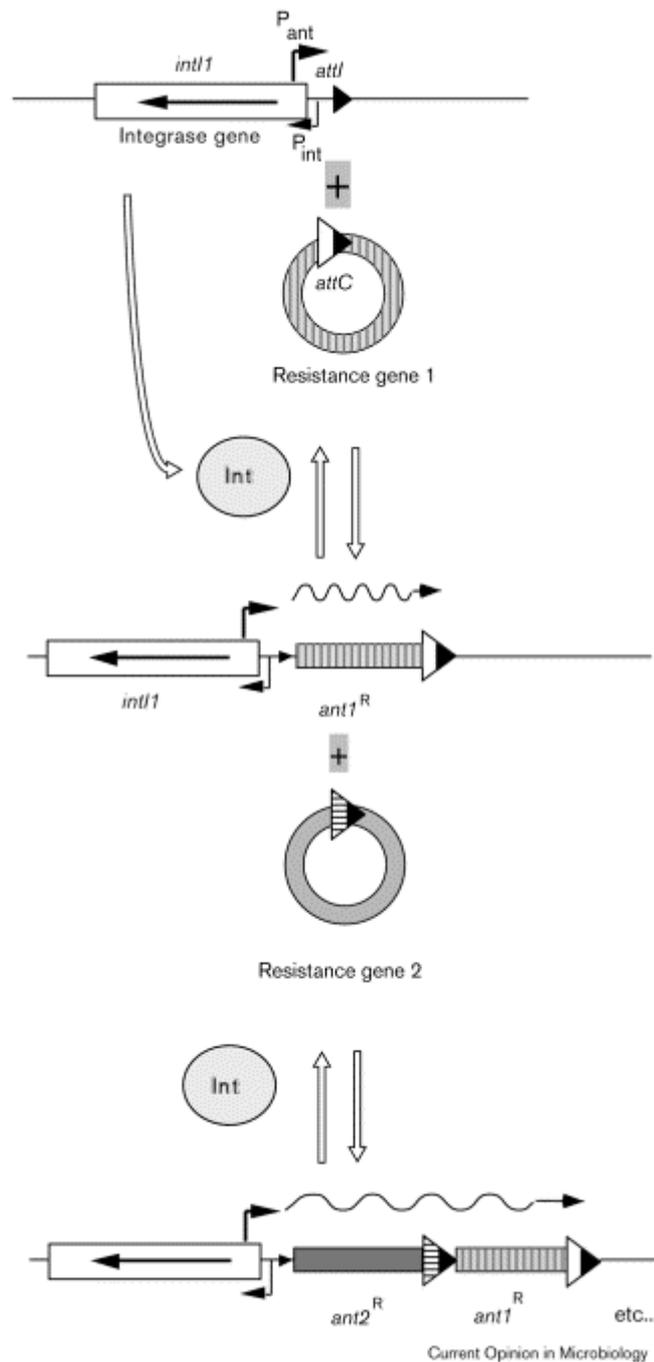


Figure 30 : Modèle d'échange de cassettes d'un intégron. Le promoteur  $P_{int}$  contrôle l'expression d'une intégrase permettant l'insertion de la cassette contenant le gène de résistance à un antibiotique au niveau du site *attI* en aval du promoteur  $P_{ant}$ . Ainsi, plusieurs cassettes de résistance peuvent s'intégrer les unes à la suite des autres (Rowe-Magnus et Mazel, 1999)

## VII Conclusion

A l'issue de cette revue bibliographique des *Vibrio* pathogènes, des mécanismes de HGT et des mécanismes de virulence acquis par des HGT, il apparaît clairement que le concept de maladie infectieuse d'origine bactérienne ne peut se restreindre à la définition de l'action unique d'une bactérie pathogène sur l'organisme hôte. Une maladie infectieuse résulte bien plus des interactions hôte/bactérie pathogène, ou chacun des acteurs joue un rôle primordial dans l'expression de la maladie.

Par ailleurs les exemples de HGT (conférant un nouveau facteur de virulence, une nouvelle voie de régulation ou un nouveau mécanisme améliorant l'adaptabilité), montrent bien qu'une bactérie n'est pas figée dans le temps mais qu'elle peut au contraire évoluer de façon rapide et radicale, lui permettant de s'adapter à de nouvelles niches écologiques, de diversifier son cycle de vie et de développer de nouveaux « comportements » ; ainsi de nouveaux pathogènes peuvent émerger, ou alors la virulence d'un agent déjà pathogène peut s'accroître considérablement. Le cas de *V. cholerae* constitue en la matière un exemple frappant. Cette bactérie comprend des souches à virulence extrêmement variable, réparties dans plus de 200 sérogroupes, dont les sérogroupes O1 et O139 responsables d'épidémies ; *V. cholerae* peut passer une partie de son cycle de vie dans le milieu aquatique, puis une fois ingéré par l'homme, il peut s'adapter à ce nouvel environnement, le coloniser et enfin exprimer une virulence menant à la maladie ; cette adaptation à une nouvelle niche et l'expression d'un phénotype virulent est passée notamment par l'acquisition de facteurs de virulence tels que CT, TCP, RTX et la conversion antigénique via des épisodes de HGT. Par ailleurs, la régulation de l'expression de CT passe par le phage satellite RS1 et par ToxT localisé au niveau du VPI, qui régule également le TCP, ces deux éléments RS1 et VPI ayant également été acquis par HGT.

L'étude d'une maladie nécessite donc une approche intégrative visant aussi bien l'hôte que l'agent pathogène et l'environnement. Au niveau du pathogène il convient donc d'abord d'évaluer le degré de variabilité intra-spécifique et les différents statuts de virulence éventuels ; puis de rechercher des marqueurs génétiques de la virulence pour le développement d'outils diagnostiques et de caractériser les facteurs de virulence afin d'appréhender le mécanisme infectieux. La recherche de ces facteurs peut se faire conjointement à celle de HGT souvent impliqués dans leur acquisition et d'autant plus qu'on se situe dans un contexte de maladie émergente ou face à un agent infectieux dont la virulence a été accrue. Ces différentes démarches ont été développées au cours de ce travail de thèse vis-à-vis de *V. nigrispulchritudo* en Nouvelle-Calédonie.



---

## CHAPITRE I

### Etude de la variabilité génétique de souches de *Vibrio nigripulchritudo*, isolées en Nouvelle-Calédonie

---

## Sommaire du chapitre I

<b>Introduction et objectifs</b>	<b>75</b>
I Matériels et méthodes pour l'étude de la variabilité génétique de souches de <i>V. nigripulchritudo</i> isolées en Nouvelle-Calédonie.	78
I.1 Collection de souches	78
I.1.1 Choix des souches	78
I.1.2 Préparation des suspensions bactériennes et extraction d'ADN génomique	80
I.1.3 Caractérisation de la virulence par injection intra-musculaire d'une suspension bactérienne	81
I.2 Génotypage par Multi Locus Sequence Typing (MLST)	82
I.2.1 Amplification de gènes de ménage par PCR et purification	82
I.2.2 Réaction de séquence, purification et séquençage	83
I.2.3 Analyse phylogénétique	83
I.3 Génotypage par Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) <i>gyrB</i>	84
I.4 Génotypage par Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR)	84
II Résultats	84
II.1 Analyse de la variabilité génétique d'une collection de <i>V. nigripulchritudo</i> par une approche MLST	84
II.2 Profils de restriction de l'analyse en PCR-RFLP	86
II.3 Analyse de la variabilité génétique d'une collection de <i>V. nigripulchritudo</i> par une approche AP-PCR	87
III Discussion	89
<b>Conclusions</b>	<b>92</b>

## Etude de la variabilité génétique de souches de *Vibrio nigrapulchritudo* isolées en Nouvelle-Calédonie

### Introduction et objectifs

Le typage moléculaire est utilisé dans des études épidémiologiques à différentes échelles, locale ou globale. Dans un contexte local de mortalités, ces techniques permettent d'étudier la proximité des souches bactériennes prélevées, la structuration génétique d'une population bactérienne ou encore la clonalité des isolats ; le problème majeur est donc d'estimer le degré de variabilité génétique des souches bactériennes incriminées. Dans le cadre d'études épidémiologiques sur une large échelle, on cherche à comparer des isolats bactériens incriminés dans des phénomènes pathologiques comparables, mais prélevés sur des aires géographiques et/ou à des échelles de temps différentes, en effectuant une analyse phylogénétique.

Pour ce faire, de nombreux outils de typage moléculaire sont disponibles. Globalement on distingue les techniques basées sur l'étude de la variabilité génétique de l'ensemble du génome, de celles ciblant spécifiquement certains gènes.

Dans la première approche, c'est-à-dire les techniques basées sur l'étude de la variabilité génétique de l'ensemble du génome, on retiendra les techniques très largement utilisées d'électrophorèse d'ADN génomique en champ pulsé (PFGE pour Pulsed-Field Gel Electrophoresis) et de PCR aléatoires :

- La PFGE consiste en une migration électrophorétique d'ADN génomique après digestion par une enzyme de restriction à coupures rares, en les soumettant à un champ électrique variable en direction et en intensité permettant la séparation de fragments de grande taille. Ces techniques mettent donc en évidence des différences génétiques non caractérisées, puisque c'est la variabilité de l'ensemble du génome pris de façon aléatoire qui est étudiée. Un ou des gènes ne sont donc pas ciblés, mais bien un ensemble de *loci* non déterminés. Ainsi, les variations génétiques indexées par ces méthodes s'accumulent rapidement, puisque aussi bien les zones variables du génome que les zones conservées sont visées. Ceci peut présenter un avantage dans une problématique d'épidémiologie locale car le pouvoir de résolution de cette technique permet de révéler des différences génétiques entre souches quasi-clonales (Maiden *et al.*, 1998). Cependant, pour une plus grande échelle d'étude, l'accumulation rapide de variations peut présenter un désavantage, en ce sens que cela engendre une trop grande sensibilité inhérente à la PGFE et que l'on peut ainsi passer à côté de groupes clairement identifiables avec d'autres techniques de typage présentant une moindre résolution.

- Les techniques de PCR aléatoire regroupent la « Random Amplified Polymorphic DNA » (RAPD), la « DNA Amplification Fingerprinting » (DAF), la « Repetitive Extragenic Palindromic PCR »

(REP-PCR) et « l'Arbitrarily Primed PCR » (AP-PCR) ; ces PCR amplifient de façon aléatoire, des séquences d'ADN sur l'ensemble du génome. L'AP-PCR mise au point par Welsh et McClelland en 1990, consiste en une amplification par PCR d'un ensemble de fragments à partir d'une amorce s'hybridant de façon aléatoire sur l'ADN génomique total de la souche bactérienne étudiée. Un dendrogramme est ensuite construit sur la base des profils d'électrophorèse, reflétant la variabilité génétique au sein d'une même espèce bactérienne. L'AP-PCR a par exemple été utilisée chez les leptospires (Perolat *et al.*, 1994), chez *Borrelia burgdorferi* (Welsh *et al.*, 1992), ou encore chez des *Vibrio* (Goarant *et al.*, 1999).

Il est généralement convenu avec ces techniques d'au moins dupliquer les profils de typage (deux restrictions avec deux enzymes différentes pour la PFGE, deux amplifications avec des amorces différentes pour les amplifications arbitraires) afin de limiter les risques de surestimation des distances génétiques entre souches qui ne seraient liées qu'à de faibles variations de séquences (voire des mutations ponctuelles).

La seconde approche cible spécifiquement des *loci* particuliers. Par exemple la « Multilocus Enzyme Electrophoresis » (MLEE), la « PCR Restriction Fragment Length Polymorphism » (PCR-RFLP) et le « Multilocus Sequence Typing » (MLST) :

- La MLEE est basée sur l'analyse de la mobilité électrophorétique d'enzymes de ménage ciblées (présentant une faible vitesse d'évolution). Si elle a beaucoup été utilisée avant l'avènement de l'amplification génique, elle présente toutefois l'inconvénient, d'exclure la mise en évidence dans la séquence nucléotidique du gène, de mutations ponctuelles silencieuses ou de mutations ne modifiant pas la charge électrique de l'enzyme.
- La PCR-RFLP enfin, consiste en l'analyse des profils de restriction d'un amplicon après digestion enzymatique.
- La MLST a été mise au point par Maiden *et al.* en 1998 pour l'étude de la variabilité phylogénétique des souches appartenant à *Neisseria meningitidis*. Depuis, cet outil a été utilisé pour l'étude de nombreuses autres espèces bactériennes notamment celles virulentes pour l'homme. La MLST est une méthode de typage moléculaire basée sur le séquençage de fragments de plusieurs gènes de ménages (gènes ubiquistes pour une population, caractérisés par une vitesse d'évolution modérée et codant des protéines essentielles impliqués dans le métabolisme) ou de gènes dit informationnels (gènes ubiquistes pour une population, caractérisés par une très faible vitesse d'évolution et codant des protéines impliquées dans des fonctions essentielles comme la transcription et la traduction) (Cooper et Feil, 2004). L'ensemble des techniques présentées dans l'introduction de ce chapitre, présente un problème majeur de reproductibilité des résultats d'un laboratoire à l'autre. La MLST qui dérive de la MLEE présente l'avantage majeur par rapport aux autres techniques de typage moléculaire d'être reproductible entre différents laboratoires, du fait même de son principe qui repose sur l'analyse directe de la séquence nucléotidique de plusieurs gènes de ménage (Maiden *et al.*, 1998 ; Urwin et

Maiden, 2003). Les données de typage sont donc exportables et peuvent être centralisées dans une base de données internationale, permettant des études épidémiologiques à une large échelle.

Dans ce chapitre, une approche polyphasique (Vandamme *et al.*, 1996) combinant trois techniques, MLST, PCR-RFLP et AP-PCR, a été utilisée pour l'analyse de la variabilité génétique d'une collection de souches de *V. nigripulchritudo*. La pathogénicité de ces isolats bactériens a été étudiée en infection expérimentale par injection intra-musculaire d'une suspension bactérienne et a permis de mettre en évidence trois statuts de virulence distincts : des souches hautement pathogènes (HP), moyennement pathogènes (MP) et non pathogènes (NP). Ce typage moléculaire polyphasique avait plusieurs objectifs :

- La confirmation de l'appartenance des souches étudiées à la seule espèce *V. nigripulchritudo*. Comme précisé dans l'introduction, on parvient facilement à identifier *V. nigripulchritudo* par une approche biochimique. En effet, toutes les souches *V. nigripulchritudo* forment un pigment noir caractéristique lorsqu'elles sont cultivées sur un milieu Marine Agar enrichi avec 2% (P/Vol) de glycérol (Bergey, 1984). On peut toutefois faire l'hypothèse que d'autres espèces bactériennes inconnues développent ce même phénotype. L'appartenance des souches isolées à l'espèce *V. nigripulchritudo* devait donc être confirmée par MLST, en utilisant la souche type de l'espèce *V. nigripulchritudo* CIP103195<sup>T</sup> (Baumann *et al.*, 1984).
- L'estimation du degré de variabilité génétique des souches de la collection de *V. nigripulchritudo*, de façon à répondre à un certain nombre de questions :
  - Comment les isolats définis par un pathotype particulier caractérisé par infection expérimentale (HP, MP ou NP) se regroupent-ils d'un point de vue génétique ? Des corrélations entre pathotypes et génotypes sont-elles observées ?
  - Par ailleurs nous disposons d'isolats de *V. nigripulchritudo* HP provenant de quatre contextes d'isolement : les souches isolées dans un contexte de Syndrome d'été, celles isolées dans un contexte de Syndrome 93, celles isolées dans un contexte de mortalités dites « opportunistes » et celles isolées hors contexte morbide. La problématique à ce niveau est donc de savoir si ces différents isolats HP appartiennent ou non à des groupes génotypiques distincts.
  - Enfin, si les souches HP isolées de crevettes subissant le Syndrome d'été présentaient une faible variabilité génétique, la question de l'émergence et de la dissémination d'un nouveau pathogène revêtirait une importance épidémiologique majeure et pourrait nécessiter une prise en compte zoosanitaire différente.

- La sélection des deux souches de *V. nigripulchritudo* pour l'approche soustractive SSH (Suppressive Subtractive Hybridization) développée dans le chapitre II : une souche HP associée au Syndrome d'été et une souche NP.

## I Matériels et méthodes pour l'étude de la variabilité génétique de souches de *V. nigripulchritudo* isolées en Nouvelle-Calédonie.

### I.1 Collection de souches

#### I.1.1 Choix des souches

Cinquante sept souches de *V. nigripulchritudo* ont été sélectionnées parmi les quelques 300 isolées de mai 1995 à novembre 2003 sur l'ensemble des fermes de production de crevettes en Nouvelle-Calédonie. D'autres souches ont par ailleurs été étudiées. La souche type *V. nigripulchritudo* CIP103195<sup>T</sup> (=ATCC 27043), constitue la souche de référence. Enfin la souche *V. penaeicida* AM101, isolée en Nouvelle-Calédonie dans un contexte de Syndrome 93, a été utilisée comme groupe externe pour l'ancrage des arbres phylogénétiques issus de la MLST et de l'AP-PCR. Parmi les souches de *V. nigripulchritudo* isolées, on distingue les souches cliniques, des souches isolées de crevettes saines ou moribondes mais sans agent bactérien incriminé et des souches environnementales :

- les souches cliniques provenant chacune de l'hémolymphe d'une crevette développant une septicémie : des souches de *V. nigripulchritudo* isolées parmi d'autres espèces à partir de l'hémolymphe de crevettes subissant le Syndrome 93 (3 souches) ; des souches isolées d'hémocultures monomorphes dans un contexte de Syndrome d'été (7 souches) ; des souches isolées au cours de vibrioses opportunistes (9 souches, dont deux isolats issus de la même crevette), lorsque seules quelques crevettes sont retrouvées mortes en bord de bassins d'élevage, sur un temps limité et en dehors de tout contexte de mortalité massive typique du Syndrome d'été,
- d'autres souches issues d'hémocultures, ont été isolées de crevettes saines (24 souches, dont 3 isolats issus de la même crevette). Rappelons ici que l'hémolymphe des crevettes, contrairement au système sanguin des vertébrés, n'est pas un milieu stérile et qu'il est commun d'y détecter une flore bactérienne cultivable et notamment des *Vibrio*,
- d'autres souches ont été isolées à partir de crevettes moribondes, mais dans des contextes de mortalité sans agent bactérien incriminé (4 souches).

Dans tous ces cas, un seul clone a été conservé par crevette (excepté pour les souches Wn13 et Wn14 d'une part et les souches AgMn1, AgMn2 et AgMn3 d'autre part) puisqu'on a fait l'hypothèse que la septicémie chez la crevette correspondait à une expansion « clonale » de la bactérie incriminée (Goarant *et al.*, 2006) ; des travaux ultérieurs pourraient être développés pour confirmer cette hypothèse de travail.

- Enfin des souches environnementales ont été isolées de différents compartiments : eau de pompage d'une ferme affectée par le Syndrome d'été (2 souches) ; eau ou sédiments des bassins dans deux fermes affectées par le Syndrome d'été (7 souches) et cuticule d'un crabe sain *Portunus pelagicus* (1 souche).

Sur ces 59 souches, 25 sont utilisées pour l'étude en MLST. Les isolats proviennent de 13 fermes et de 3 écloséries situées le long de la côte ouest de la Nouvelle-Calédonie. Le statut de virulence de chaque souche a été déterminé par infection expérimentale comme indiqué dans le paragraphe I.1.3 de ce chapitre. Un récapitulatif des caractéristiques des isolats bactériens utilisés dans cette étude est présenté dans le Tableau 1. Les 25 souches étudiées en MLST ont été déposées dans la collection de bactéries du CRB (Centre de Ressources Biologiques, Laboratoire Génétique et Pathologie de l'IFREMER La Tremblade, <http://www.IFREMER.fr/crb/>).

Nom de souche	Date d'isolement	contexte	Virulence	MLST et PCR-RFLP
CIP 103195T		<i>V. nigripulchritudo</i> souche type	NP	x
AM102	May 1995	Syndrome 93, hémoculture crevette moribonde	HP	x
AM 115	May 1995	Syndrome 93, hémoculture crevette moribonde	HP	x
SO65	May 1995	Syndrome 93, hémoculture crevette moribonde	HP	x
<b>SFn1</b>	March 2000	Syndrome d'été, hémoculture crevette moribonde	HP	x
<b>SFn2</b>	March 2000	Syndrome d'été, hémoculture crevette moribonde	HP	
<b>SFn27</b>	December 2000	Eau du Sédiment, bassin affecté par mortalités	HP	x
<b>SFn48</b>	November 2001	Syndrome d'été, hémoculture crevette moribonde	HP	
<b>SFn49</b>	November 2001	Eau de bassin de grossissement, bassin affecté par mortalités	HP	
<b>SFn105</b>	February 2002	Eau de bassin de grossissement, bassin affecté par mortalités	HP	
<b>SFn106</b>	February 2002	Syndrome d'été, hémoculture crevette moribonde	HP	
<b>SFn111</b>	March 2002	Carapace de crabe sain ( <i>Portunus pelagicus</i> ), ferme affectée par mortalités	NP	
<b>SFn115</b>	March 2002	Eau du lagon au niveau du pompage, ferme affectée par mortalités	NP	x
<b>SFn118</b>	April 2002	Eau du lagon au niveau du pompage, ferme affectée par mortalités	NP	x
<b>SFn127</b>	November 2002	Hémoculture de crevette saine, avant mortalités	HP	
<b>SFn128</b>	December 2002	Syndrome d'été, hémoculture crevette moribonde	HP	
<b>SFn135</b>	December 2002	Eau de bassin de grossissement, bassin affecté par mortalités	HP	x
<b>AgMn1</b>	October 2003	Hémoculture de crevette saine, avant mortalités (même animal)	NP	x
<b>AgMn2</b>			NP	
<b>AgMn3</b>			NP	
<b>AgMn7</b>	November 2003	Hémoculture de crevette saine, avant mortalités	HP	
<b>AgMn8</b>	November 2003	Syndrome d'été, hémoculture crevette moribonde	HP	
<b>AgMn9</b>	November 2003	Eau de bassin de grossissement, bassin affecté par mortalités	HP	
<b>AgMn10</b>	November 2003	Syndrome d'été, hémoculture crevette moribonde	HP	
<b>AgMn12</b>	November 2003	Eau du Sédiment, bassin affecté par mortalités	HP	
<b>AgMn13</b>	November 2003	Eau du Sédiment, bassin affecté par mortalités	HP	

<i>POn2</i>	April 2002	Hémoculture de crevette saine, bassin sain 2, ferme saine	HP	
<i>POn3</i>	April 2002	Hémoculture de crevette saine, bassin sain 3, même ferme saine	HP	x
<i>POn4</i>	April 2002	Hémoculture de crevette saine, bassin sain 6, même ferme saine	NP	x
<i>POn10</i>	December 2002	Hémoculture de crevette moribonde, pas de vibriose, bassin sain 5, même ferme saine	NP	
<i>POn12</i>	December 2002	Hémoculture de crevette saine, bassin sain 4, même ferme saine	NP	x
<i>POn13</i>	December 2002	Hémoculture de crevette saine, bassin sain 4, même ferme saine	NP	x
<i>POn19</i>	January 2003	Hémoculture de crevette saine, bassin sain 4, même ferme saine	HP	x
<i>AMn3</i>	March 2003	Hémoculture de crevette moribonde, vibriose opportuniste	HP	x
<i>AMn4</i>	March 2003	Hémoculture de crevette moribonde, vibriose opportuniste, même épisode	HP	
<i>SON1</i>	July 2001	Hémoculture de crevette moribonde, pas de vibriose	NP	
<i>SON2</i>	March 2003	Hémoculture de crevette saine, bassin sain, même ferme saine	NP	
<i>FTn1</i>	January 2001	Hémoculture de crevette moribonde, pas de vibriose	NP	
<i>FTn2</i>	March 2003	Hémoculture de crevette saine, bassin sain, même ferme saine	HP	
<i>SBn2</i>	March 2003	Hémoculture de crevette saine, bassin sain, même ferme saine	NP	
<i>Wn1</i>	January 2001	Hémoculture de crevette moribonde, vibriose opportuniste	MP	x
<i>Wn3</i>	January 2001	Hémoculture de crevette moribonde, vibriose opportuniste	MP	x
<i>Wn13</i>	November 2002	Hémoculture de crevette moribonde, vibriose opportuniste (même animal)	MP	x
<i>Wn14</i>			MP	
<i>BDn1</i>	February 2003	Hémoculture de crevette saine, bassin sain, même ferme saine	MP	
<i>BDn2</i>	February 2003	Hémoculture de crevette saine, bassin sain, même ferme saine	MP	
<i>Fn1</i>	February 2003	Hémoculture de crevette saine, bassin sain, même ferme saine	MP	
<i>Fn2</i>	February 2003	Hémoculture de crevette saine, bassin sain, même ferme saine	NP	x
<i>AQn1</i>	March 2003	Hémoculture de crevette saine, bassin sain, même ferme saine	MP	x
<i>AQn2</i>	March 2003	Hémoculture de crevette saine, bassin sain, même ferme saine	MP	
<i>MT1</i>	January 2000	Hémoculture de crevette moribonde, vibriose opportuniste, géniteur	MP	
<i>BLFn1</i>	March 2001	Hémoculture de crevette moribonde, vibriose opportuniste	MP	x
<i>BLFn2</i>	December 2001	Hémoculture de crevette moribonde, vibriose opportuniste	MP	
<i>ENn1</i>	June 2000	Hémoculture de crevette saine, géniteur sain	NP	
<i>ENn2</i>	June 2000	Hémoculture de crevette saine, géniteur sain	MP	x
<i>SVn2</i>	April 2002	Hémoculture de crevette moribonde, pas de vibriose	NP	
<i>SVn3</i>	February 2003	Hémoculture de crevette saine, même ferme saine	NP	x
<i>ESn2</i>	June 2000	Hémoculture de crevette saine, géniteur sain	NP	
<i>V. penaeicida</i> AM 101	May 1995	Syndrome 93, hémoculture crevette moribonde	HP	x

Tableau 1: Isolats de *V. nigripulchritudo* utilisés pour les études MLST et AP-PCR : sont indiqués le nom des isolats, les dates et contextes de prélèvement, ainsi que le statut de virulence hautement pathogène (HP), moyennement pathogène (MP) ou non pathogène (NP). En gras : les isolats issus de fermes affectées par le Syndrome d'été. En italique : les isolats collectés au cours de campagnes de prélèvements recherchant spécifiquement *V. nigripulchritudo*

### I.1.2 Préparation des suspensions bactériennes et extraction d'ADN génomique

Les souches bactériennes ont été conservées à -80°C dans du milieu 2216E (Difco) additionné de glycérol à 15%. Les souches ont été cultivées dans 5 ml de Marine Broth, à 30°C sous agitation continue, jusqu'à la phase stationnaire atteinte au bout de 18 h environ. Les ADN génomiques des souches ont ensuite été extraits au phénol chloroforme-alcool isoamylique après digestion à la protéinase K selon la méthode de Sambrook et Russel (2001).

### I.1.3 Caractérisation de la virulence par injection intra-musculaire d'une suspension bactérienne

L'infection expérimentale par injection intra-musculaire d'une suspension bactérienne permet de définir différents pathotypes des souches étudiées. Au démarrage de cette thèse, la virulence de l'ensemble des souches de *V. nigripulchritudo* étudiées avait déjà été défini par l'équipe pathologie de l'IFREMER de Nouvelle-Calédonie (Goarant *et al.*, 2005), selon le protocole ici présenté. Les concentrations des suspensions bactériennes sont estimées par lecture de leur densité optique à 600nm, comparées à une courbe de référence définie antérieurement, puis vérifiées *a posteriori* par étalement sur gélose nutritive des suspensions bactériennes utilisées lors de l'infection. Des doses de 50 à 500 UFC (Unité Formant Colonie) sont injectées en intra-musculaire à des juvéniles de *L. stylirostris* transférés ensuite dans des aquariums remplis de 30L d'eau de mer filtrée. L'injection intramusculaire d'une suspension bactérienne entre les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> segments abdominaux, ne respecte pas les voies naturelles d'infection mais permet de s'assurer de la pénétration de la souche bactérienne étudiée dans l'hôte. Des aquariums contenant 8 à 10 crevettes chacun sont destinés à l'étude de la pathogénicité de chacune des souches réalisée en duplicat (Figure 31). Les crevettes témoins d'infection reçoivent une injection d'eau de mer stérile d'un volume équivalent à celui injecté pour les souches bactériennes. Le suivi des mortalités est effectué 3 à 5 fois par jour durant 3 jours. Les animaux survivants sont dénombrés lors du bilan réalisé au terme de ce suivi. Les souches sont considérées comme étant hautement pathogènes (HP) si la mortalité est supérieure à 80% ; moyennement pathogène (MP) pour des mortalités entre 20 et 80% et non pathogènes si la mortalité est inférieure à 20% (Figure 8). La survie des témoins d'infection doit être de 100%.



Figure 31: Salle d'infection expérimentale de l'IFREMER de Nouvelle-Calédonie constituée de 24 aquariums de 30 L utilisée pour évaluer la pathogénicité des isolats de *V. nigripulchritudo*

## I.2 Génotypage par Multi Locus Sequence Typing (MLST)

### I.2.1 Amplification de gènes de ménage par PCR et purification

Six gènes conservés, impliqués dans différents mécanismes cellulaires de base et présents sur les deux chromosomes ont été utilisés pour le typage en MLST (Le Roux *et al.*, 2005). Il s'agit des gènes :

- *rciB* : gène codant une protéine nécessaire à la réplication du chromosome II (Egan et Waldor, 2003),
- *toxR* : gène codant un régulateur transcriptionnel (Osorio et Klose, 2000),
- *16S rRNA* ou *rrs* : gène codant pour la petite sous-unité ribosomale,
- *rpoD* : gène codant un facteur sigma de l'ARN polymérase qui intervient au cours de la transcription de l'ADN (Lonetto *et al.*, 1992),
- *recA* : gène codant une protéine multifonctionnelle intervenant notamment dans la recombinaison de l'ADN et dans sa réparation (Thompson *et al.*, 2004b),
- *gyrB* : gène codant une des sous-unités de la gyrase, enzyme qui intervient dans la réplication de l'ADN (Yamamoto et Harayama, 1995 ; Le Roux *et al.*, 2004).

Ces six gènes ont été amplifiés par PCR avec des amorces universelles ou des amorces dégénérées dont les séquences sont présentées dans le tableau 2. Le mélange réactionnel de PCR se compose de tampon de PCR 1x, de MgCl<sub>2</sub> à 2,5 mM, de dNTPs à 0,2 mM, d'amorces sens et anti-sens à 0,2 μM (ou 1 μM si les amorces sont dégénérées), de 2,5 unités d'AmpliTaq ADN polymérase et de 100 à 500 ng d'ADN génomique dans un volume réactionnel total de 50 μl. Les cycles de PCR ont été réalisés sur un thermocycleur PTC-100 (MJ Research). La réaction d'amplification du gène *recA* a été effectuée selon le protocole de Thompson *et al.* (2004). Pour les autres PCR, le programme a consisté en 3 min à 94°C pour la dénaturation initiale ; suivie de 35 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à la température d'hybridation variable selon le gène, 2 min d'élongation à 72°C ; et une étape finale d'élongation de 10 min à 72°C. Les produits de PCR ont ensuite migré par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% dans du tampon TAE (Tris 0.4 M, Acétate 0.2 M, EDTA 10 mM) contenant du bromure d'éthidium (BET) à 0.5 μg.mL<sup>-1</sup>, puis ont été purifiés à l'aide du kit Qiaex II Gel Extraction (Qiagen).

gène	séquence des amorces	T°C hybridation
16S	Forward 5'- <i>CAGGAAACAGCTATGACC</i> AGAGTTTGATCATGGCTCAGA-3' Reverse 5'- <i>GTAAAACGACGGCCAG</i> GTTACCTTGTACGACTT-3'	50
gyrB	F 5'- <i>GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA</i> YGCNNGGNGNAARTTYRA-3' R 5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCNCRCRCNGYCAT-3'	58
rpoD	F 5'- <i>ACGACTGACCCGGTACGCATGTA</i> YATGMGNGARATGGGNACNGT-3' R 5'-ATAGAAATAACCAGACGTAAGTTNGCYTCNACCATYTCYTTYTT-3'	57
rct	F 5'- <i>CAGGAAACAGCTATGACC</i> ATHGARTTYACNGAYTTYCARYTNCAY- 3' R 5'-GTAAAACGACGGCCAYTTNCTYTGHATNNGGYTCRAAYTCNC CRT -3'	57
toxR	F 5'- <i>CAGGAAACAGCTATGACC</i> GANCARGGNTTYGARGTNGAYGAYTC-3' R 5'-GTAAAACGACGGCCA GTTDKKTGNCNCYNGTVGCDATNAC3'	57
recA	F 5'-TGGACGAGAATAAACAGAAAGGC-3' R 5'-CCGTTATGCTGTACCAAGCGCCC-3'	55
	AP-PCR RSP 5'-GGAAACAGCTATGACCATGA-3'	
	AP-PCR SP 5'-TTGTAACGACGGCCAG-3'	

Tableau 2: Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour l'étude en MLST et en AP-PCR. Pour la MLST, les séquences utilisées lors de la réaction de séquençage sont indiquées en italique. Les gènes amplifiés et les températures d'hybridation correspondant à chaque couple d'amorces sont également indiqués.

### I.2.2 Réaction de séquence, purification et séquençage

Le mélange réactionnel se compose de tampon 1x, de 0,4 µL de mix ABI Prism Big Dye Terminator (Applied Biosystem), de 0,6µM d'amorces sens ou anti-sens et de 10 à 40 ng de produit de PCR purifié, pour un volume total de 10 µL. La réaction de séquence a été effectuée sur un thermocycleur Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystem) et a consisté en une dénaturation initiale de 2 min à 96°C suivie de 25 cycles de 10 s à 96°C, de 5 s à 50°C et de 4 min à 60°C. La séparation des fragments d'ADN a été effectuée sur un séquenceur ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) à 16 capillaires, disponible au LGP, en utilisant un capillaire de 36 ou de 50 cm et du polymère POP7.

### I.2.3 Analyse phylogénétique

Les séquences des six gènes *16S rRNA*, *rpoD*, *rctB*, *recA*, *gyrB*, *toxR* de *V. nigripulchritudo* et de *V. penaeicida* ont été alignées à l'aide du logiciel BioEdit® (Hall, 1999) en utilisant Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant le programme Phylo\_win (Galtier *et al.*, 1996) avec la méthode de Neighbour Joining appliquée aux distances à 2 paramètres de Kimura (Gascuel, 1987). La fiabilité de la topologie a été évaluée par la méthode des bootstraps en réalisant 1000 répliqués. Les séquences obtenues à partir de la souche *V. penaeicida* AM101 ont été utilisées pour l'ancrage des arbres.

### I.3 Génotypage par Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) *gyrB*

Une PCR-RFLP a été effectuée sur un fragment du gène *gyrB* de l'ensemble des 24 souches de *V. nigripulchritudo* étudiées. Le principe de cette méthode est de réaliser une digestion enzymatique du produit de PCR généré à partir de chacune des souches puis d'analyser les profils de restriction obtenus par électrophorèse. Le mélange réactionnel se compose de tampon 1x, de 4 unités d'enzymes de restriction *AluI*, de 18 µL de produit de PCR purifié *gyrB*, pour un volume total de 20 µL incubé pendant 1 h à 37 °C.

### I.4 Génotypage par Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR)

Parallèlement au génotypage par MLST et PCR-RFLP, l'équipe pathologie du DAC IFREMER Nouvelle-Calédonie a effectué un typage des souches par AP-PCR, sur l'ensemble de la collection de *V. nigripulchritudo*. Le mélange réactionnel de PCR aléatoire se compose de tampon de PCR 1x, de MgCl<sub>2</sub> à 4 mM, de dNTPs à 0,2 mM chacun, de 1,25 unités d'ADN polymérase (Qiagen), de 100 ng d'ADN génomique ; les amplifications arbitraires se font à l'aide d'amorces RSP et SP (Tableau 2) testées par Goarant *et al.* (1999). Les cycles de PCR ont été réalisés sur un thermocycleur Gene-Amp 9700 (Applied BioSystems) avec un profil de température faiblement stringente appliqué sur les 2 premiers cycles, suivis de 40 cycles en condition thermique plus stringente. Après migration électrophorétique à 40 V pendant 16h, seules les bandes les plus intenses ont été retenues pour l'analyse des profils au travers d'une grille type présence/absence de bandes traduites par « 1 » ou « 0 ». La matrice résultante a été analysée à l'aide du logiciel PopGene 16 (Yeh et Boyle, 1997) permettant ainsi la construction d'un dendrogramme basé sur les distances génétiques de Nei (Nei, 1978).

## II Résultats

### II.1 Analyse de la variabilité génétique d'une collection de *V. nigripulchritudo* par une approche MLST

Un arbre phylogénétique a été construit à partir de l'analyse des séquences concatémérisées des six gènes totalisant 3430 pb (Figure 32). On obtient un minimum de 97% d'homologie entre les séquences nucléotidiques concatémérisées des 24 souches étudiées les plus divergentes. Le gène présentant le plus de polymorphisme en séquence nucléotidique est *gyrB* avec au minimum 95% de similarité contre 96% pour *recA*, 97% pour *toxR*, 98% pour *rpoD*, 98% pour *rctB* et 99% pour *16S rRNA*. L'analyse de la structuration génétique des souches permet de révéler deux groupes phylogénétiques distincts :

- Un groupe A présentant un très faible degré de variabilité génétique (moins de 1% de divergence) où seules sont représentées des souches virulentes, soit HP (dont la totalité des souches associées au Syndrome d'été), soit MP.

- Un groupe B présentant le même degré de variabilité génétique, mais comprenant la totalité des premières souches de *V. nigripulchritudo* isolées en Nouvelle-Calédonie lors de mortalités observées dans un contexte de Syndrome 93 ainsi qu'une souche NP POn4, isolée d'une crevette saine.

- L'ensemble des autres souches ni A ni B présentent toutes le pathotype NP. Contrairement aux groupes A et B la typologie de ces souches apparaît fortement variable selon le gène considéré (résultats non présentés).

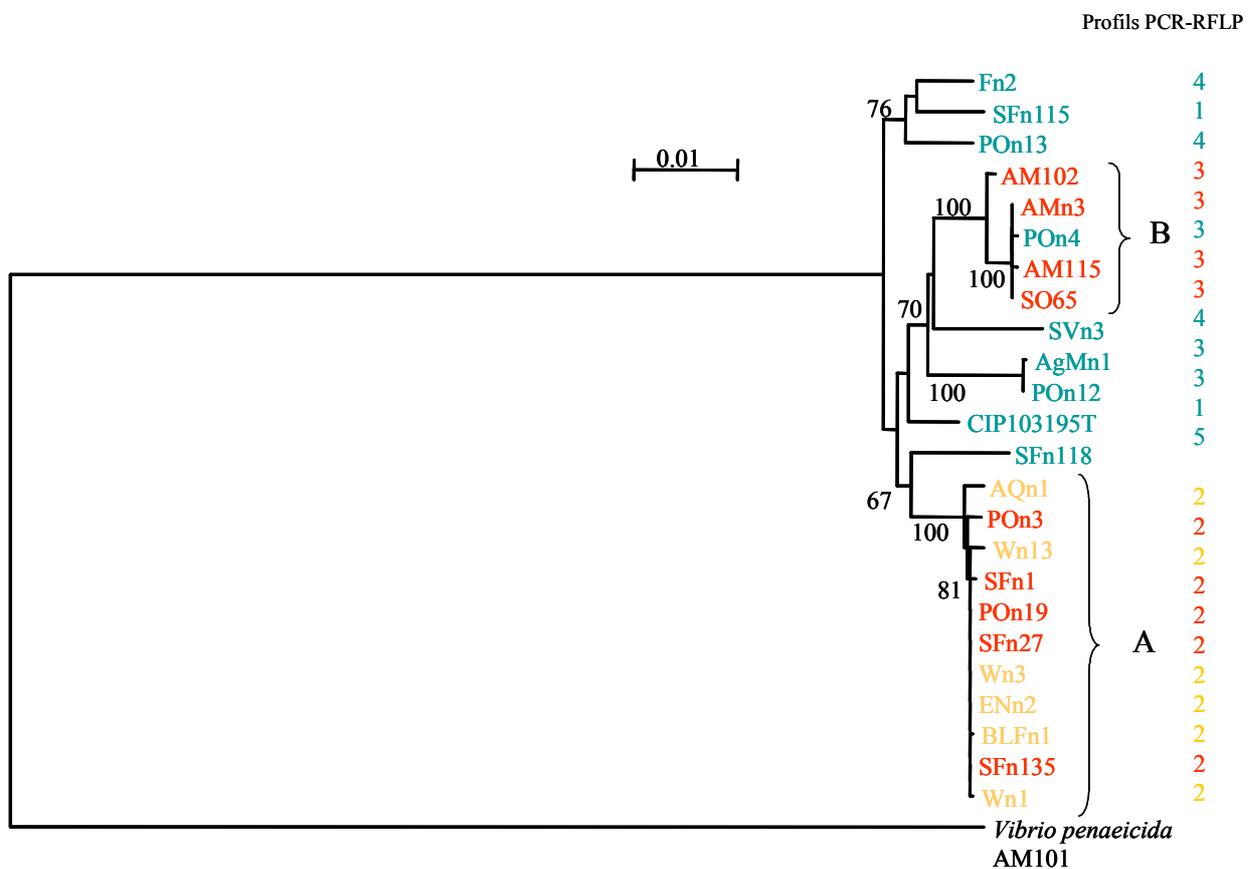


Figure 32: Arbre phylogénétique issu de l'étude MLST, construit à partir des séquences de six gènes *rctB*, *toxR*, *16S rRNA*, *rpoD*, *recA* et *gyrB* concatémérisées (3430 pb). En rouge les souches bactériennes HP, en orange les souches MP et en vert les souches NP. Deux groupes phylogénétiques A et B ont été mis en évidence. Le type de profils obtenus en PCR-RFLP sur *gyrB* est reporté à droite par un numéro choisi arbitrairement.

## II.2 Profils de restriction de l'analyse en PCR-RFLP

Cinq profils de restriction différents ont été obtenus en PCR-RFLP sur le gène *gyrB* pour les 24 souches de *V. nigripulchritudo* étudiées (Figure 33). Ces profils sont tous parfaitement cohérents, puisque les tailles des bandes retrouvées correspondent effectivement à celles des cartes de restriction déduites de l'analyse des séquences *gyrB* (résultats non présentés). D'autre part, les différents profils en PCR-RFLP sont congruents avec la typologie des arbres phylogénétiques obtenus par MLST (Figure 32): le profil de restriction N° 2 caractérise le groupe A ; le profil de restriction N° 3 concerne pour l'essentiel le groupe phylogénétique B, à l'exception de deux souches (AgMn1 et POn12). Les autres isolats NP ni A ni B, se partagent les profils RFLP restants N° 1, 4 et 5.

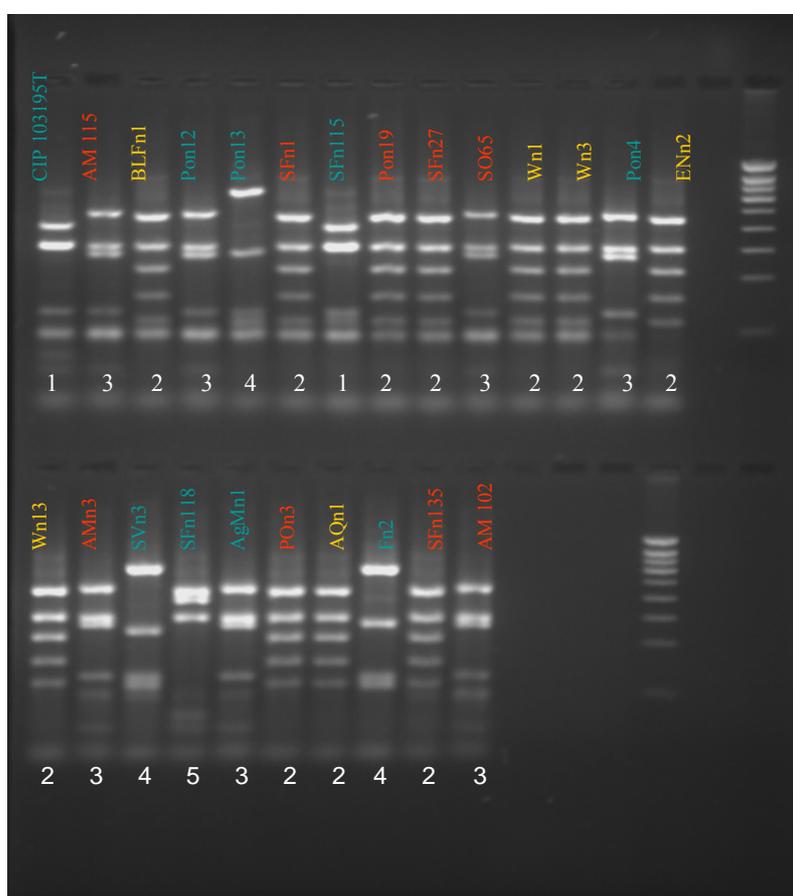


Figure 33: Profils de PCR-RFLP obtenus à partir des produits de PCR *gyrB* digérés par *AluI* des 24 souches de *V. nigripulchritudo* également étudiées en MLST. Le numéro des profils est indiqué en blanc. En rouge les souches HP, en orange les souches MP et en vert les souches NP

### II.3 Analyse de la variabilité génétique d'une collection de *V. nigripulchritudo* par une approche AP-PCR

Chacune des deux amorces utilisées RSP et SP, a permis l'amplification de l'ADN de l'ensemble des souches étudiées, avec plus de 18 bandes différentes pour chaque isolat, sur un total de 28 et 26 amplicons de tailles différentes générées par l'utilisation des amorces SP et RSP respectivement. Ces profils d'amplification arbitraire permettent une discrimination infra-spécifique des souches de *V. nigripulchritudo* (Figure 34). En ne considérant que les bandes majoritaires, chaque profil compte 6 à 12 bandes pour chaque amorce. La matrice analytique de type présence/absence se base sur la distribution de 46 bandes discriminantes au sein de 58 souches de *V. nigripulchritudo* et d'une souche de *V. penaeicida* souche AM101. Le dendrogramme résultant de cette analyse est présenté dans la Figure 35. L'ensemble des souches HP et MP se retrouvent dans deux groupes phylogénétiques particuliers A' et B' présentant une faible diversité génétique. L'ensemble des autres souches présente le pathotype NP.

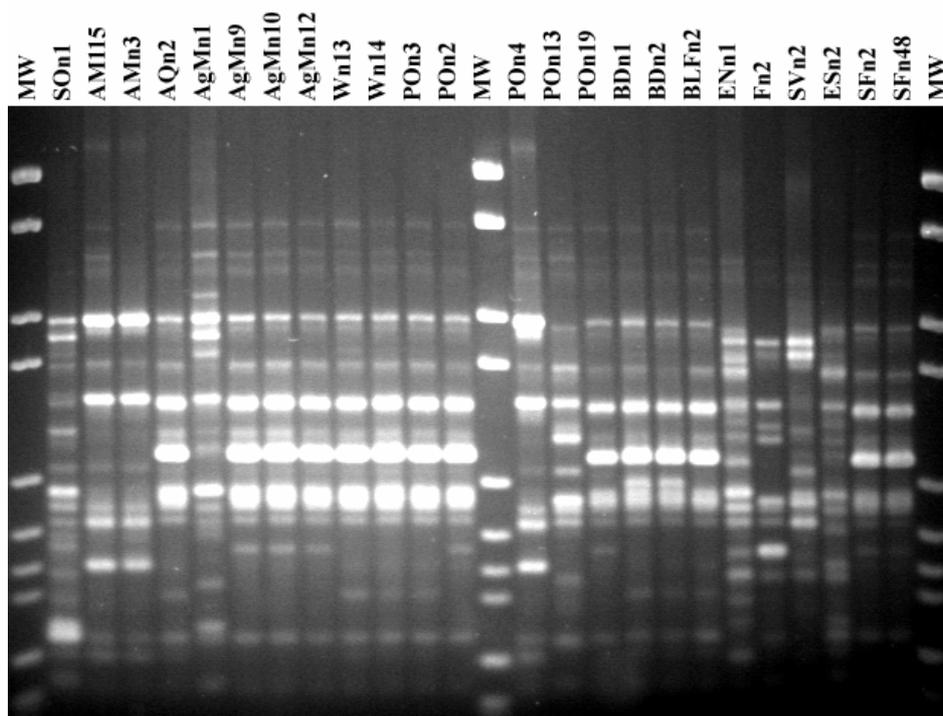


Figure 34: Exemple de profils d'AP-PCR obtenus avec l'amorce SP à partir de souches de *V. nigripulchritudo*

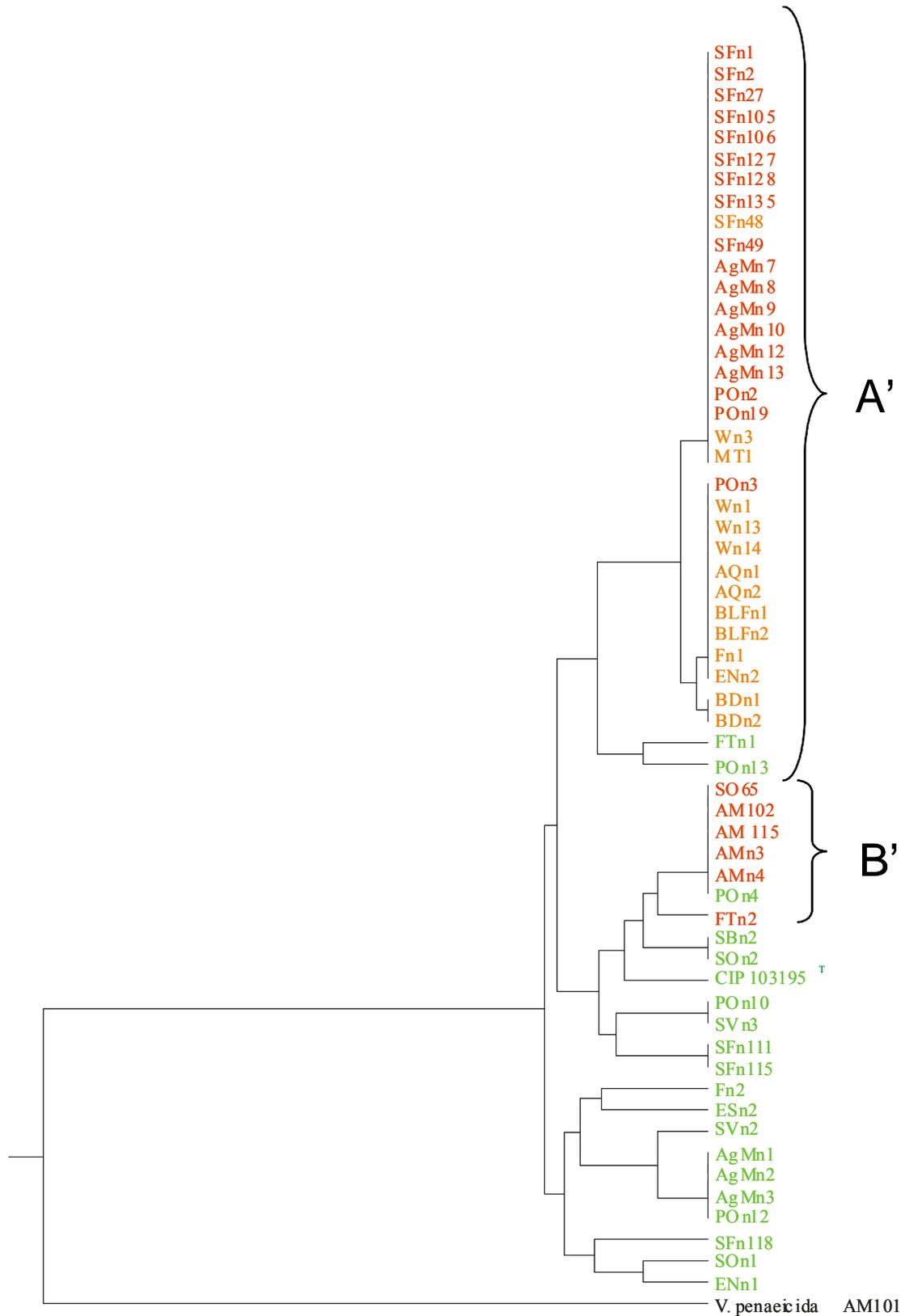


Figure 35: Dendrogramme dessiné sur la base d'une matrice type présence/absence des amplicons majoritaires issus de l'AP-PCR utilisant les amorces RSP et SP. En rouge les souches bactériennes HP, en orange les souches MP et en vert les souches NP

### III Discussion

Ces analyses phylogénétiques ont permis de confirmer l'appartenance des souches étudiées à l'espèce *V. nigrispulchritudo*. D'après Stackebrandt et Embley (2000), un seuil d'identité de 98% entre les séquences d'ARNr16S des isolats bactériens permet de définir l'appartenance de souches à la même espèce. Dans cette étude, un minimum de 99% de similitude a été obtenu entre les séquences partielles des ARNr16S de 24 souches de *V. nigrispulchritudo*, dont la souche type CIP103195<sup>T</sup>, confirmant l'appartenance de ces souches à l'espèce *V. nigrispulchritudo*. Par ailleurs ces souches sont retrouvées dans chacun groupes phylogénétiques mis en évidence en AP-PCR. Ceci permet de déduire que les 34 autres souches non étudiées en MLST appartiennent bien également à l'espèce *V. nigrispulchritudo*.

D'après le comité *ad hoc* pour la re-évaluation de la définition d'espèce bactérienne (Stackebrandt *et al.*, 2002), un minimum de cinq gènes est nécessaire pour l'étude par MLST des relations inter et intra-spécifiques. Ces gènes doivent être situés aux niveaux de *loci* chromosomiques différents. Cependant, Cooper et Feil (2004) considèrent que le nombre de gènes à prendre en compte dépend de la longueur séquencée de chaque gène et du degré de variabilité génétique des souches bactériennes à caractériser. Par exemple, certaines espèces bactériennes telles que *Bacillus anthracis* ou *Mycobacterium tuberculosis* se révèlent quasi clonales sur la base de l'analyse de gènes de ménage. Les hypothèses avancées dans ces études pour expliquer une aussi faible variabilité génétique, reposent soit sur l'émergence des souches analysées soit sur l'existence d'un goulot d'étranglement génétique du fait d'une forte pression de sélection. Dans le cas où une population bactérienne se caractériserait par un très faible degré de variabilité génétique inter-souches, une analyse en MLST sur la base de seulement sept gènes ne serait pas assez discriminante. Dans ces cas particuliers, il conviendrait en conséquence de séquencer un nombre bien plus important de gènes de ménage, certains auteurs se basant sur une trentaine de gènes cibles (Sreevatsan *et al.*, 1997). On note cependant, que pour la plupart des espèces bactériennes documentées, quatre à huit gènes suffisent amplement en MLST pour apprécier le degré de variabilité génétique de l'espèce, avec un pouvoir de résolution suffisant.

Dans cette étude en MLST, six gènes différents ont été séquencés. Les séquences partielles des gènes étudiés sont supérieures ou égales à 493 pb : 549 pb pour l'ARNr16S, 673 pb pour *gyrB*, 617 pb pour *rpoD*, 562 pb pour *rctB*, 536 pb pour *recA* et 493 pb pour *toxR*. Enright et Spratt (1999) estiment que pour la plupart des bactéries pathogènes, une taille des fragments de gènes étudiés en MLST comprise entre 400 et 500 pb est suffisante dans des études épidémiologiques impliquant des phénomènes de mortalité. Nos résultats de typage le confirment.

Les trois techniques de typage moléculaire ici développées permettent de mettre en évidence les mêmes groupes phylogénétiques : A et B en MLST, correspondant aux groupes A' et B' en AP-PCR et les profils de restriction N°2 et 3 en PCR-RFLP. La congruence des résultats entre une analyse de la variabilité génétique de gènes de ménage (MLST) et une analyse sur la totalité du génome (AP-PCR), permet d'inter-valider les conclusions sur la structuration génétique des isolats étudiés. On peut donc considérer que l'analyse épidémiologique qui suit repose sur une approche génomique polyphasique solide.

### **Analyse phylogénétique et données épidémiologiques**

Deux groupes phylogénétiques principaux ont été mis en évidence :

- Le groupe phylogénétique B (en MLST) ou B' (en AP-PCR), est caractérisé par un très faible degré de variabilité génétique, de l'ordre de 99,8% d'identité nucléotidique pour le gène *gyrB* (gène présentant le plus de polymorphisme dans cette étude MLST). Ce groupe est constitué des souches de *V. nigripulchritudo* HP (AM102, AM115 et SO65) isolées dans un contexte de Syndrome 93 qui partagent une même aire géographique restreinte, la baie de Moindou (Goarant *et al.*, 1999), ainsi que d'autres souches de la même baie isolées dans un contexte de mortalités opportunistes au cours de l'été 2002-2003 (AMn3 et AMn4). Ceci suggère que les souches HP associées au Syndrome 93, pourraient également être associées à des mortalités dites opportunistes au cours des mois estivaux et ne présenteraient donc pas de caractère saisonnier marqué.
- Le groupe phylogénétique principal A (en MLST) ou A' (en AP-PCR) est également caractérisé par un très faible degré de variabilité génétique sur la base des séquences analysées, avec 99,8% d'identité pour la séquence nucléotidique du gène *gyrB* (le gène présentant le plus de polymorphisme génétique), ce qui correspond à 100% d'identité au niveau de la séquence en acides aminés codée par ce gène. Le caractère extrêmement peu polymorphe des souches du groupe phylogénétique A, qui constitue une entité génétique clairement distincte des autres isolats de *V. nigripulchritudo*, suggère l'origine relativement récente de ce groupe.

Le groupe A comprend notamment tous les isolats HP incriminés dans des mortalités type Syndrome d'été, isolés de l'hémolymphe de crevettes moribondes sur les deux seules fermes affectées jusqu'alors par la maladie, quelle que soit la date d'isolement, en couvrant quatre cycles différents de production.

D'autres souches HP appartenant au même groupe A ont été isolées d'échantillons environnementaux du bassin (eau du sédiment, eau de bassins) suggérant que les souches type Syndrome d'été pourraient transmises à la crevette depuis le milieu.

On retrouve par ailleurs dans le même groupe phylogénétique A des souches bactériennes HP isolées de l'hémolymphe de crevettes saines, hors contexte de mortalité type Syndrome d'été. Ceci

laisse bien supposer que ces isolats HP ne retrouvent pas les conditions favorables à leur développement et à une infection septicémique chez la crevette. On peut donc estimer que d'autres facteurs interviennent dans le processus de mortalité que la simple présence de souches de *V. nigripulchritudo* HP, tels que des facteurs intrinsèques à la crevette (immunité, stade de mue par exemple) ou des facteurs environnementaux. L'étiologie du Syndrome d'été serait donc bien multifactorielle, sur le modèle développé par Sniezsko (1973) comme considéré dans le programme d'étude DéSanS. On peut également faire l'hypothèse du rôle de la flore bactérienne naturelle chez la crevette, dans le contrôle de la flore pathogène, par un effet probiotique. La flore bactérienne naturelle des invertébrés marins pourrait en effet participer à leur protection contre les bactéries pathogènes. Rosenberg *et al.* (2007) ont par exemple suggéré l'hypothèse d'un effet probiotique de la flore bactérienne naturelle du Corail *Oculina patagonica*, notamment vis-à-vis du pathogène *V. shilonii*.

Le fait que les souches pathogènes constitutives du groupe phylogénétique A, soient clairement différenciées des souches HP du groupe B type Syndrome 93, suggère que l'émergence de ce groupe A résulte de la sélection de nouvelles souches pathogènes à l'intérieur des fermes aquacoles, plutôt que de l'extension géographique de souches de *V. nigripulchritudo* HP associées au Syndrome 93.

Le groupe A contenant également des souches MP, se pose alors la question de la distinction de ces souches avec les souches HP, à deux titres : quels sont les marqueurs génétiques et parmi eux les gènes de virulence responsables du statut HP type Syndrome d'été ? Quel(s) outils diagnostiques permettraient de différencier ces deux pathotypes au sein du groupe A ?

**La corrélation entre marqueurs génétiques, c'est-à-dire entre le groupe phylogénétique A (clairement délimité) et la virulence (HP ou MP),** sur la base de la variabilité génétique de gènes de ménage, suggère une liaison génétique entre marqueurs taxonomiques et virulence, donc une localisation chromosomique d'au moins une partie des gènes codant des protéines impliquées dans la virulence.

On peut faire l'hypothèse que les souches MP partagent au moins en partie les gènes conférant le degré moyen de virulence avec les souches HP type Syndrome d'été et d'autant plus que l'AP-PCR, qui explore l'ensemble du génome et non pas seulement des gènes de ménage, ne sépare pas clairement les deux pathotypes HP et MP. Cependant, ces souches HP pourraient posséder en plus du « patron » commun de gènes conférant le statut MP, un ou plusieurs gènes, menant à ce phénotype HP. Ces gènes pourraient soit coder de nouveaux effecteurs de la virulence, soit coder des gènes de régulation permettant l'expression de gènes de virulence déjà existants. Par ailleurs, on peut avancer l'hypothèse de l'acquisition d'une partie de ces gènes par un mécanisme de transfert horizontal de gènes (HGT). Ces différentes hypothèses ont constitué pour la suite une base de travail. Toutefois l'hypothèse inverse pourrait également être avancée : les souches HP du groupe phylogénétique A pourraient avoir perdu un répresseur d'un ou de plusieurs gènes de virulence, qui de fait

s'exprimeraient pleinement chez ces souches. Quel que soit le remaniement génétique ayant abouti à la distinction des pathotypes HP et MP au sein du groupe A, ce mécanisme a pu permettre l'émergence de souches HP menant à l'émergence du Syndrome d'été.

#### **La question du diagnostic des souches HP type Syndrome d'été :**

Au sein de ce groupe A, aucune des souches MP n'est différenciée des souches HP en MLST et en AP-PCR ces souches ne sont pas clairement différenciées non plus. L'utilisation de ces techniques de typage moléculaire comme outil diagnostique, ne permet donc pas de distinguer avec certitude, au sein du groupe phylogénétique A, une souche MP d'une souche HP type Syndrome d'été, sans recours à une infection expérimentale. Ces techniques de typage moléculaire et d'infection expérimentale étant relativement longues et coûteuses à mettre en place, la nécessité de développer un autre outil diagnostique plus discriminant, apparaît à ce niveau évidente. La recherche des bases génétiques de la virulence, pourrait donc mener à identifier un ou plusieurs marqueurs génétiques de la virulence permettant la distinction des deux pathotypes du groupe A.

#### **Conclusions**

Ces analyses portant sur la variabilité génétique d'une collection de souches de *V. nigrripulchritudo*, ont permis de déterminer la structuration génétique au sein de cette espèce, avec notamment la mise en évidence du groupe phylogénétique qui ne comprend que des souches virulentes MP ou HP, dont l'ensemble des souches HP associées au Syndrome d'été. Les bases génétiques de cette distinction restent inconnues, tout comme les gènes supports de la virulence des souches HP type Syndrome d'été. Afin d'identifier des marqueurs génétiques corrélés à la virulence de souches HP type Syndrome d'été, dont certains gènes directement impliqués dans la virulence, une banque soustractive a été construite par SSH (Suppression Subtractive Hybridization). L'identification de ces marqueurs de virulence pourrait par ailleurs permettre de développer de nouveaux outils diagnostiques permettant la distinction des deux pathotypes du groupe A, facilitant le suivi épidémiologique des souches impliquées dans les mortalités associées au Syndrome d'été. Ces approches sont présentées dans le chapitre II.

---

## **CHAPITRE II**

### **Identification de marqueurs génétiques de la virulence de souches de *V. nigripulchritudo* pathogènes en Nouvelle-Calédonie**

---

## Sommaire du chapitre II

<b>Introduction et objectifs</b>	<b>95</b>
I Matériel et méthodes de la SSH	100
I.1 Choix des souches de <i>V. nigripulchritudo</i> pour la construction de la banque SSH : le Tester SFn1 et le Driver SFn118	100
I.2 Soustraction entre SFn1 et SFn118 par SSH, un rapide aperçu de la méthode	101
I.3 Criblage de la banque SSH par hybridation ADN/ADN en macro-array	102
I.4 Séquençage des fragments d'ADN spécifiques du Tester SFn1 et analyses des séquences	103
II Résultats	104
II.1 Gènes identifiés par SSH et potentiellement associés à la virulence	104
II.2 Corrélation entre marqueurs génétiques et statuts de virulence	107
II.3 Marqueurs génétiques d'intérêt identifiés par macro-array	109
II.3.1 Gènes potentiellement associés à la virulence	109
II.3.2 Fragments d'ADN présentant la signature d'éléments génétiques mobiles	109
II.3.3 COG inconnus et protéines hypothétiques conservées	109
III Discussion	111
<b>Conclusions</b>	<b>114</b>

## **Identification de marqueurs génétiques de la virulence de souches de *V. nigrripulchritudo* pathogènes originaires de Nouvelle-Calédonie**

### **Introduction et objectifs**

Le typage moléculaire de la collection de 58 souches de *V. nigrripulchritudo* isolées en Nouvelle-Calédonie a permis de mettre en évidence le groupe phylogénétique A, caractérisé par un très faible degré de variabilité génétique et ne présentant que des souches virulentes MP ou HP, dont l'ensemble des souches HP isolées dans un contexte de Syndrome d'été. D'un point de vue diagnostique, la distinction des deux pathotypes du groupe A restait à ce niveau de l'étude impossible par les outils de typage disponibles (MLST, PCR-RFLP, AP-PCR et PCR en temps réel), sans recours à l'évaluation du statut de virulence de chaque souche au moyen d'infections expérimentales. Dans ces conditions, le développement d'outils de diagnostic plus rapides à mettre en œuvre, moins coûteux et permettant d'identifier les souches HP associées au Syndrome d'été revêt un intérêt considérable. Sur un plan plus cognitif, il semblait également primordial de déterminer quels étaient les gènes à la base du déterminisme génétique de la virulence des souches HP associées au Syndrome d'été. C'est la raison pour laquelle des marqueurs génétiques de la virulence, spécifiques de ce pathotype particulier ont été recherchés.

Différentes approches permettent l'identification de marqueurs génétiques de la virulence chez les procaryotes. Celles qui sont les plus couramment utilisées font appel à la protéomique, à la transcriptomique par la mutagenèse aléatoire par transposons (RTM pour Random Transposon Mutagenesis) et par la mutagenèse par transposons marqués (STM pour Signature-tagged Transposon Mutagenesis), au séquençage partiel ou complet de génomes et enfin à des techniques d'hybridation soustractive.

- Approches de protéomique pour l'identification de protéines sécrétées, impliquées dans la virulence :

Certains facteurs de virulence des bactéries sont excrétés de la cellule. Ces protéines peuvent être purifiées à partir des produits extra-cellulaires (ECP pour ExtraCellular Products) et séparées par la technique hautement résolutive d'électrophorèse bidimensionnelle (E2D). L'E2D permet de séparer les protéines selon deux critères physico-chimiques : le point isoélectrique et le poids moléculaire. L'analyse différentielle des profils protéiques obtenus par E2D permet d'isoler et de repérer les protéines d'intérêt. Par exemple, la comparaison des profils protéiques entre une souche virulente et

une souche non virulente au sein d'une espèce bactérienne peut permettre d'isoler des protéines excrétées associées à la virulence (Trost *et al.*, 2005). Après migration et coloration, les protéines d'intérêt sont prélevées du gel et analysées en spectrométrie de masse et les empreintes peptidiques massiques sont comparées à celles des banques de données. Enfin, une étape de purification suivie d'un séquençage amino-terminal, peut permettre d'obtenir la séquence du gène codant la protéine d'intérêt.

- Stratégie de « Random Transposon Mutagenesis » (RTM) :

De nombreuses avancées dans la connaissance des mécanismes de virulence proviennent de l'utilisation de transposons pour obtenir une banque de mutants par insertion transpositionnelle. Ce type de mutagenèse utilise un marqueur de sélection (le plus souvent un gène de résistance à un antibiotique) et permet de localiser et de cloner facilement le gène muté. Il existe un grand nombre de transposons variant en fonction du marqueur de sélection, de la spécificité d'insertion, de la taille et enfin de la polarité. Ces banques de transposons peuvent ensuite être criblées selon la virulence (Golden *et al.*, 2000). Le problème majeur reste que le criblage des mutants permettant l'identification de gènes associés à un phénotype donné, est extrêmement fastidieux (Figure 37). Cette technique présente d'autres désavantages à prendre en compte : l'insertion du transposon ne se fait pas forcément de façon aléatoire, puisqu'il peut exister des zones d'insertion préférentielles (hot-spot de recombinaison) ; la RTM ne permet pas d'étudier des gènes indispensables à la survie de la bactérie puisque la mutation de tels gènes est forcément létale ; enfin, certaines bactéries restent réfractaires aux méthodes de transformation ou de conjugaison, ce qui exclut de fait l'utilisation de la RTM.

- Stratégie de Signature-tagged Transposon Mutagenesis (STM) (Figure 36) :

Cette technique est identique à la précédente dans le principe, mais la présence de séquences signatures appelée « tags » au niveau du transposon, permet l'individualisation de chaque mutant (Hensel *et al.*, 1995). L'identification des mutants atténués se fait alors par sélection négative sur l'absence du tag individuel, après sélection dans le modèle de virulence. Cette technique présente donc le net avantage par rapport à l'approche précédente, de pouvoir tester un très grand nombre de mutants, simultanément à partir de pools de mutants et non plus mutants par mutants ; par contre il existe un risque de faux négatifs, dans le cas où l'un des mutants pleinement virulent du pool complémente un mutant avirulent, par exemple avec des produits extracellulaires nécessaires à la virulence et qui profitent à tous les clones du pool infectant (Perry, 1999) ; de plus les désavantages décrits pour la RTM existent aussi pour la STM. (Figure 37) (Saenz et Dehio, 2005).

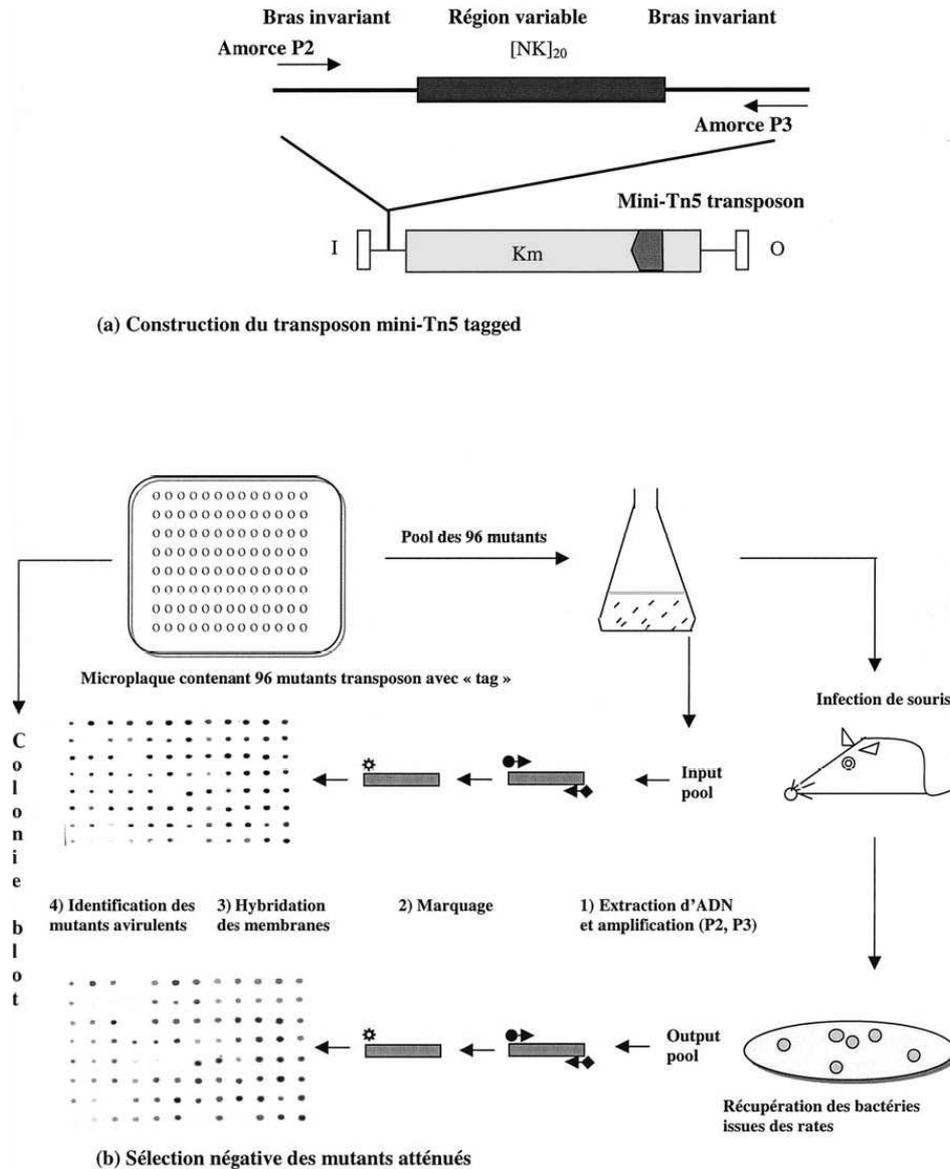


Figure 36: Représentation schématique de la STM. (a) Les « tags » sont de courtes séquences nucléotidiques qui comprennent une zone centrale de séquence aléatoire flanquée de deux bras invariants servant de matrice pour l'hybridation d'amorces spécifiques et l'amplification par PCR de la zone centrale signature. Les « tags » sont alors insérés dans le transposon mini-Tn5 Km2 (Site *Kpn*I) porté par le plasmide pUT. (b) 96 mutants mini-Tn5 Km2 de *S. typhimurium* sont rassemblés en un pool inoculum (input pool, IP). Une fraction de ce pool est utilisée pour infecter le modèle d'étude et une autre conservée pour réaliser une sonde PCR grâce aux amorces communes sur l'ADN extrait. Après un temps d'infection donné, les bactéries survivantes sont récupérées du modèle animal et de la même façon, une sonde après sélection est réalisée (output pool, OP). Les deux sondes, IP et OP, servent alors à hybrider un colony-blot des 96 mutants initialement présents dans le pool d'infection. L'absence d'hybridation de certains clones avec la sonde OP obtenue après infection indique l'absence de multiplication de ces clones dans le modèle choisi. Il suffit alors de cloner et séquencer le fragment génomique contenant le transposon pour identifier le gène de virulence candidat (Foulongne *et al.*, 2004)

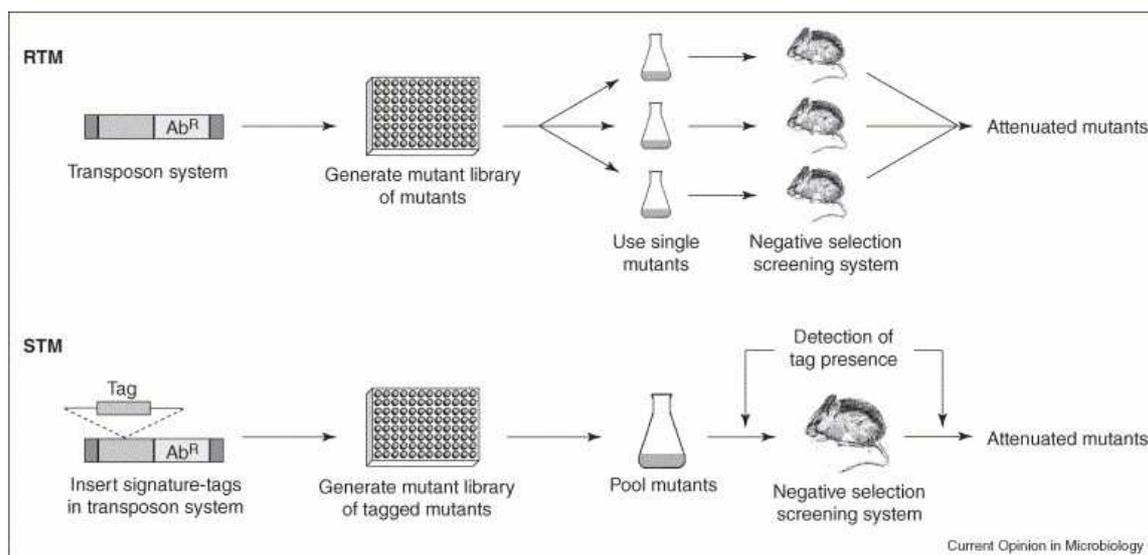


Figure 37: Comparaison des approches de mutagenèse aléatoire par transposons (RTM) et Signature-tagged Transposon Mutagenesis (STM) (Saenz et Dehio, 2005)

Pour la recherche de gènes potentiellement associés à la virulence, les deux approches précédentes nécessitent que les techniques d'évaluation de la virulence soient hautement reproductibles, en disposant par exemple de modèles animaux ou d'effets bien connus sur des lignées cellulaires.

- Séquençage partiel ou total de génomes et génomique comparative :

L'approche globale de séquençage complet, apparaît comme la méthode la plus informative. Comme notifié dans l'introduction de ce manuscrit, nombre de génomes bactériens ont aujourd'hui été entièrement séquencés, dont sept dans le genre *Vibrio*. La génomique comparative peut permettre l'identification *in silico* de gènes associés à la virulence. Malgré les progrès récents apportés par le séquençage à haut débit et les perspectives de pyroséquençage capable de traiter  $10^8$  bases en moins de 10 heures, cette approche reste très onéreuse, lourde à mettre en place et ne peut à l'heure actuelle concerner qu'un nombre restreint de souches bactériennes.

- L'approche par hybridation soustractive :

L'approche appelée génomique soustractive, vise à élucider les mécanismes moléculaires de la spécificité de souches bactériennes. Pour cela les génomes de deux souches proches d'un point de vue taxonomique sont comparés par hybridation soustractive. Les fragments différentiels sont clonés (banque soustractive), séquencés et analysés dans les banques de données.

Les techniques d'hybridation soustractive entre une souche bactérienne virulente et une souche non virulente ont déjà conduit, dans d'autres modèles, à l'identification de gènes marqueurs de virulence dont certains codant des protéines déterminant la virulence et parmi eux des gènes potentiellement acquis par HGT : chez *V. damsela* subsp. *piscicida* (agent étiologique de la

pasteurellose des poissons), les techniques de typage classiques par RAPD par exemple, n'étant que peu discriminantes pour les différents pathotypes constituant la sous-espèce (Magarinos *et al.*, 2000 ; Romalde, 2002), une approche par SSH a été développée, permettant de mettre en évidence trois éléments génétiques mobiles et un transposon conjugatif SXT-like, spécifiques de la souche hautement pathogène étudiée (Juiz-Rio *et al.*, 2005) ; chez *Burkholderia pseudomallei* (agent étiologique de la mélioïdose), un opéron permettant la synthèse d'une capsule polysaccharidique impliquée dans la virulence, probablement associé à un îlot génomique acquis par HGT, a été mis en évidence par hybridation soustractive (Reckseidler *et al.*, 2001), tandis qu'une autre étude basée sur la même souche mettait en évidence un prophage permettant de distinguer aisément *B. pseudomallei* de *B. mallei* (DeShazer, 2004) ; chez *Porphyromonas gingivalis* (bactérie périodonto-pathogène chez l'homme), des éléments génétiques mobiles IS (Insertion Sequences) ont été mis en évidence chez une souche virulente, constituant un marqueur spécifique de ces souches (Sawada *et al.*, 1999) ; chez *V. vulnificus* biotype 2, des fragments d'ADN spécifiques de ce biotype (quelque soit le sérotype considéré), ont été identifiés par SSH et localisés au niveau de plasmides (Lee *et al.*, 2005) ; la recherche de facteurs de virulence par SSH, de souches environnementales de *V. cholerae* non-O1 et non-O139 a permis l'identification du plasmide pSIOI (Purdy *et al.*, 2005).

L'approche de SSH constitue donc en théorie une bonne alternative au séquençage de génomes complets.

Au cours de cette thèse, des souches proches d'un point de vue taxonomique mais présentant une pathogénicité différente par infection expérimentale ont été sélectionnées pour une approche de SSH, afin de mettre en évidence des marqueurs de la virulence d'une souche HP type Syndrome d'été et parmi ces marqueurs, des gènes codant potentiellement pour des effecteurs de la virulence. L'hypothèse de travail avancée dans le chapitre I, repose sur le fait que les souches HP et MP pourraient posséder un certain nombre de gènes en commun conférant le statut MP, auxquels s'ajouteraient des éléments spécifiques de souches conférant alors une virulence accrue. Nous avons effectué une hybridation soustractive à partir de souches NP et HP afin de cribler le plus large panel de marqueurs de virulence possibles (liés à HP et MP). Par la suite, la distribution de ces marqueurs de virulence potentiels a été étudiée au sein de la collection de souches de *V. nigrispulchritudo* par macro-array, afin de mettre ou non en évidence, une corrélation entre présence de marqueurs, groupes phylogénétiques et les pathotypes identifiés.

## I Matériels et méthodes de la SSH

Le principe de cette méthode est de réaliser une banque soustractive, correspondant à l'ensemble des fragments d'ADN qui différencient deux génomes bactériens, c'est-à-dire présents dans un génome, mais absents ou suffisamment polymorphes par leur séquence nucléotidique dans un autre. La souche bactérienne d'intérêt est appelée « Tester », la souche de référence à partir de laquelle est effectuée la soustraction est appelé le « Driver ». Le principe de la méthode de SSH est présenté dans la figure 39. Un kit commercial a été utilisé pour la construction de la Banque SSH (Clontech PCR-Select de BD Biosciences).

### I.1 Choix des souches de *V. nigripulchritudo* pour la construction de la banque SSH : le Tester SFn1 et le Driver SFn118

Le choix des deux souches de *V. nigripulchritudo* pour la SSH a été effectué sur la base de la proximité génétique des souches analysées par typage moléculaire MLST et du caractère de virulence opposé des deux souches. Les deux souches sélectionnées pour cette étude sont : SFn1 comme Tester, une souche HP isolée dans un contexte de Syndrome d'été et SFn118 comme Driver, issue de la même ferme pénicicole, présentant le pathotype NP et isolée hors contexte de mortalité.

Une fois les deux souches sélectionnées pour la SSH, le statut de virulence de chacune a été vérifié en réalisant une nouvelle infection expérimentale, par injection intra-musculaire de crevettes *L. stylirostris* avec une suspension bactérienne. Les doses d'infection avec la souche NP ont été augmentées par rapport à celles classiquement utilisées, afin de confirmer l'absence de virulence de la souche SFn118, en injectant jusqu'à  $75 \times 10^3$  UFC par crevettes. Seule une crevette a été retrouvée morte lors du suivi des mortalités et pour la dose d'injection à 750 UFC davantage du fait du comportement de cannibalisme des crevettes que de l'effet du challenge bactérien (Figure 38).

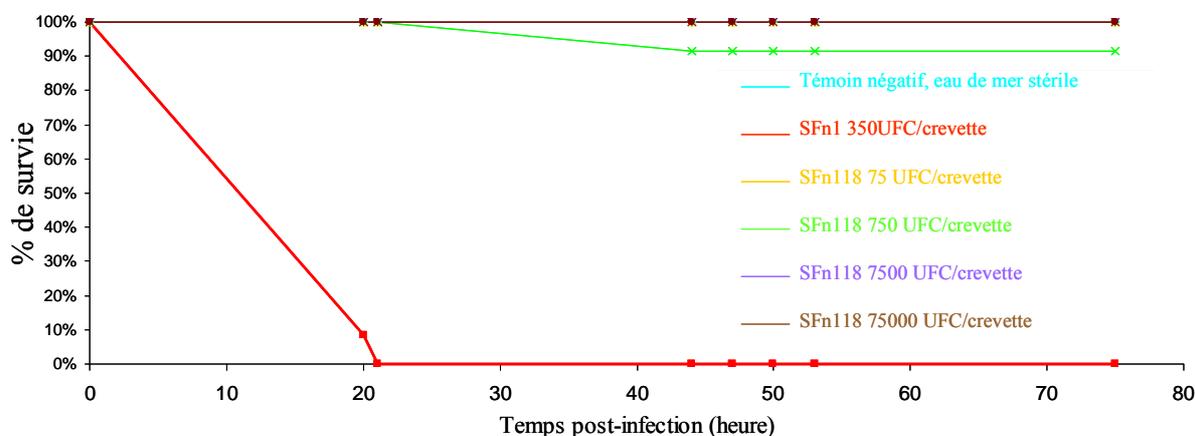


Figure 38: Cinétiques de survie de crevettes *L. stylirostris* à une infection expérimentale par une injection intra-musculaire des souches de *V. nigripulchritudo* SFn1 et SFn118, selon la dose injectée

## I.2 Soustraction entre SFn1 et SFn118 par SSH, un rapide aperçu de la méthode

L'intégralité du génome des deux souches Tester et Driver est digérée par l'enzyme de restriction *RsaI*. L'ADN génomique digéré du Tester est alors subdivisé en deux parties, chacune étant liguée à un adaptateur différent : l'adaptateur 1 d'une part et l'adaptateur 2R d'autre part. Les extrémités des adaptateurs ne sont pas phosphorylées, ainsi seul un brin de chaque adaptateur se fixe à l'extrémité 5' des fragments d'ADN digéré. La séquence des extrémités 5' de chacun des deux types d'adaptateurs est identique de façon à ce que la même amorce s'hybride en PCR par la suite. Deux séries d'hybridations sont réalisées après avoir dénaturé chacun des ADN. Dans la première série, un excès de Driver est additionné à chaque échantillon de Tester ligué avec chaque adaptateur, ce qui permet par hybridation de générer les produits A, B, C et D. Le produit A est riche en séquence spécifique du Tester tandis que les séquences non spécifiques se retrouvent hybridées au Driver dans le produit C. Au cours de la seconde hybridation, on mélange les deux produits liés aux deux types d'adaptateurs différents issus de la première série d'hybridation, plus un excès de driver et ceci sans dénaturation préalable des ADN. Ainsi, seuls les produits de type A pourront s'hybrider et former l'hybride E recherché. Ce produit E est donc constitué de séquences spécifiques du Tester avec des adaptateurs différents (1 et 2R) à chaque extrémité. Les extrémités libres situées au niveau des adaptateurs sont complétées à l'aide d'une polymérase. L'ensemble des produits est ensuite soumis à une PCR afin d'amplifier les séquences spécifiques du Tester : les produits A, C et D pour lesquels manquent à leurs extrémités au moins un site complémentaire de la séquence de l'amorce de PCR utilisée, ne seront pas amplifiés, ou subiront une amplification asymétrique, non exponentielle. En ce qui concerne le produit B, celui-ci va se replier sur lui-même du fait de la complémentarité souhaitée de séquence des adaptateurs à chacune des extrémités des fragments d'ADN, empêchant ainsi toute amplification exponentielle des produits durant la PCR. *In fine*, seul le produit E qui présente des adaptateurs différents va être amplifié de façon exponentielle par PCR. Afin de gagner en spécificité et d'enrichir le pool d'ADN en séquences spécifiques du Tester, une réamplification par PCR nichée (ou nested PCR), à l'aide d'amorces complémentaires de la séquence de chacun des adaptateurs est ensuite effectuée (Figure 39).

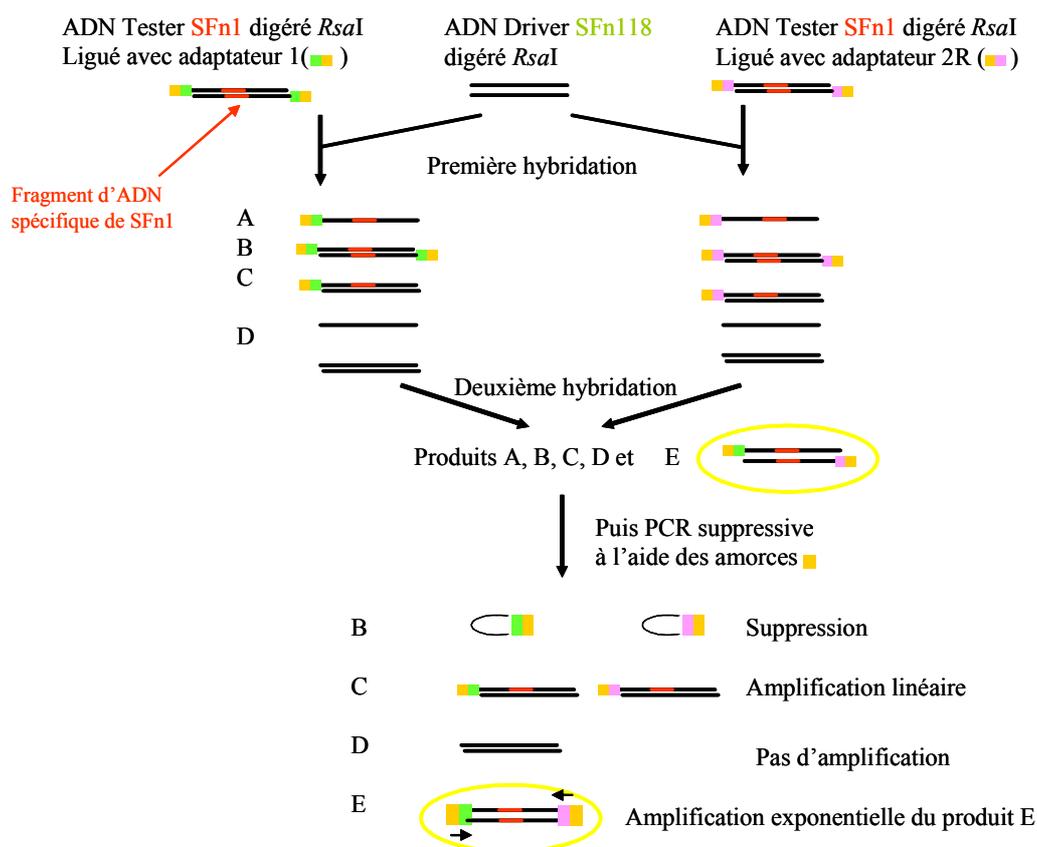


Figure 39: Représentation schématique du principe de la SSH

#### Clonage de la banque SSH :

Les produits de nested PCR générés par SSH et théoriquement spécifiques du Tester SFn1, sont intégrés dans le vecteur plasmidique pCR®II à l'aide du TA Cloning Kit (Invitrogen), ce qui permet ensuite la transformation des bactéries *Escherichia coli* compétentes TOP10. Le criblage des clones recombinants se fait sur milieu Luria-Bertani (LB) additionné d'ampicilline ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) en présence de X-gal ( $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

#### I.3 Criblage de la banque SSH par hybridation ADN/ADN en macro-array

Un premier criblage a été réalisé de façon à éliminer les fragments d'ADN faux positifs : le but de ce criblage est donc de vérifier la spécificité des fragments sélectionnés par SSH, en démontrant leur absence du génome de la souche Driver. Les produits de PCR de l'insert dénaturés issus de la SSH ont été déposés en double sur deux membranes de Nylon différentes (Millipore), l'une hybridée avec une sonde d'ADN génomique marquée issue du Tester (membrane Tester), l'autre avec une sonde d'ADN génomique issue du Driver (membrane Driver). Brièvement, les sondes sont toutes deux marquées par la technique de « random priming » en utilisant des dUTPs couplés à la Digoxygénine (Roche Diagnostics). Les hybrides (entre ADN génomique marqué à la DIG et fragments SSH) spécifiques du

Tester SFn1 ont été révélés à l'aide d'une immunoréaction en utilisant un anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline (Roche) et son substrat constitué d'un mélange de NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride) et de BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt). L'obtention d'un précipité insoluble violet présent exclusivement sur la membrane Tester signifie que le produit de PCR considéré correspond à un fragment d'ADN réellement spécifique de la souche Tester. Si pour un amplicon donné, on obtient un signal d'hybridation très marqué sur la membrane Tester, mais faible sur la membrane Driver, cela peut s'expliquer par la formation d'un hétéro-hybride présentant un polymorphisme de séquence et donc signifier que la séquence de l'amplicon est spécifique de la souche Tester. Enfin, un signal de même intensité entre les deux membranes, traduit le caractère non spécifique du fragment d'ADN considéré, présent dans les 2 génomes du Tester et du Driver.

La distribution de ces fragments d'ADN issus de la SSH a ensuite été étudiée au sein de la collection de souches de *V. nigripulchritudo*, afin de rechercher une corrélation entre présence de marqueurs, groupes phylogénétiques et les pathotypes identifiés. Pour cela les fragments de SSH ont été hybridés en macro-array avec les génomes d'une collection de souches de *V. nigripulchritudo*, selon le même protocole que celui utilisé pour le criblage de la banque SSH.

#### I.4 Séquençage des fragments d'ADN spécifiques du Tester SFn1 et analyses des séquences

Les vecteurs plasmidiques sélectionnés, portant des fragments spécifiques du Tester, ont été amplifiés à l'aide du kit Templi Phi Amplification (Amersham Biosciences). Une réaction de séquençage a ensuite été réalisée selon le protocole décrit dans le paragraphe I.2.2 du chapitre I.

Les séquences obtenues ont été comparées avec les séquences disponibles sous GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) à l'aide du logiciel Blast X (Altschul *et al.*, 1997). Blast X permet de comparer les 6 traductions possibles d'une séquence de nucléotides (3 sur chaque brin) avec une base de données de protéines. Seuls les alignements de séquences ayant une E-value inférieure à  $10^{-5}$ , ont été considérées comme significatifs (Zhang *et al.*, 2000). La E-value correspond au nombre d'alignements attendus par hasard ayant un score supérieur au score obtenu dans la banque considérée ; plus la valeur est faible, plus l'alignement est fiable, autrement dit, une faible valeur de E-value indique que le résultat n'est pas dû au hasard ; la E-value dépend du nombre total de résidus contenus dans la banque de données. Pour chaque fragment d'ADN de la banque SSH, la fonction putative associée par la banque de donnée GenBank a donné lieu à une recherche bibliographique, de façon à déterminer s'il s'agit de gènes impliqués ou non dans la virulence chez d'autres espèces bactériennes.

## II Résultats

Un total de 1112 clones de la banque SSH a été criblé par macro-array en utilisant deux sondes marquées d'ADN génomique, générées à partir de SFn1 ou de SFn118. Le criblage par hybridation puis immunorévélation, a permis d'identifier 622 fragments d'ADN spécifiques de SFn1, soit 55,9 % de fragments spécifiques issus de la SSH. Le séquençage de ces fragments spécifiques a révélé 521 séquences exploitables. Parmi celles-ci, 50 correspondent à des fragments d'ADN qui ont été retrouvés deux ou plusieurs fois dans la banque SSH (soit un taux de redondance de 29%), ce qui a permis la sélection de 368 fragments d'ADN uniques. Parmi ces fragments uniques, 143 (38,8%) ne montrent aucune homologie significative avec des gènes connus dans la base de données GenBank : ces fragments d'ADN sont donc référencés comme COG (Cluster of Orthologous Genes) inconnus. Ceux restants, soit 225 fragments d'ADN, contiennent tous un cadre de lecture ouvert (ORF pour Open Reading Frame) et présentent des homologies significatives avec des produits de gènes identifiés chez d'autres espèces bactériennes. Une classification de ces gènes en COG révèle que 43 de ces fragments d'ADN correspondent à des protéines hypothétiques conservées (11,7%), décrites chez d'autres bactéries dont la fonction n'a pas été clairement établie. Les autres ORFs correspondent à des gènes codant diverses fonctions métaboliques et de structure (38,2%); on retrouve également des éléments génétiques mobiles (5,2%) tels que des transposases IS (Insertions Sequences), des intégrases, des gènes présentant une signature virale ou plasmidique ainsi que 13 fragments de gènes (3,5%), codant des protéines potentiellement associées à la virulence de SFn1.

### II.1 Gènes identifiés par SSH et potentiellement associés à la virulence (Tableau 3)

Treize fragments d'ADN issus de la SSH codent potentiellement des facteurs de virulence :

Clone SSH	taille du fragment SSH (pb)	taille de l'homologue (pb)	alignement de séquence Genbank avec blast X	E-Value	Identité (%)	N° accession de l'homologue
106	255	2061	vulnibactin outer membrane receptor precursor [ <i>Vibrio vulnificus</i> ]	3,00E-15	56	AAF28471
108	313	897	Flp pilus assembly protein TadB [ <i>Vibrio cholerae</i> RC385]	1,00E-28	60	EDN12985
164	333	1560	mviN protein [Vibrionales bacterium SWAT-3]	5,00E-38	77	ZP_01814982
198	336	8811	RTX protein or Autotransporter adhesin [ <i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6]	2,00E-07	42	NP_761533
203	356	1953	possible hemolysin-type calcium-binding protei [Synechococcus sp. WH 8102]	1,00E-11	42	NP_898382
216	480	2034	Chain A, Chondroitinase Ac Lyase [ <i>Flavobacterium Heparinum</i> ]	7,00E-09	24	1CB8_A
226	359	9009	cytotoxin Mcf [Pseudomonas fluorescens PF-5]	8,00E-15	43	YP_260089
337	521	1452	internalin-related protein [Porphyromonas gingivalis W83]	2,00E-11	33	NP_904662
352	480	1059	Secreted trypsin-like serine protease [ <i>Vibrio splendidus</i> 12B01]	9,00E-27	42	ZP_00992251
374	425	393	WbfB protein [ <i>Vibrio fischeri</i> ES114]	6,00E-13	69	YP_203540
458	252	8361	mcyA [ <i>Microcystis aeruginosa</i> ]	1,00E-14	54	BAA83992
486	481	1023	capsule biosynthesis protein capA [ <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482]	4,00E-14	50	NP_810259
611	332	1305	TadG-like protein [ <i>Vibrio</i> sp. MED222]	2,00E-10	36	ZP_01065509

Tableau 3: Analyse des séquences spécifiques de SFn1 issues de la SSH et spécifiant des protéines potentiellement impliquées dans la virulence

- La « **Trypsin-like serine protease** » (clone SSH352): Ladhani (2003) a montré que chez *Staphylococcus aureus* (responsable chez l'homme du Syndrome d'exfoliation généralisée), la toxine exfoliative responsable des affections de l'épiderme, était une trypsin-like serine protease. Cette toxine agit au niveau de la desmogléine 1, une glycoprotéine des desmosomes, impliquée dans l'adhésion des cellules épithéliales de l'épiderme.

- **La chondroïtinase AC lyase** (clone SSH216) : cette enzyme entraîne la dépolymérisation des glycoaminoglycanes (GAG) de type chondroïtine-sulfates A et C, chondroïtine et acide hyaluronique, contenus dans les tissus conjonctifs (Gu *et al.*, 1995 ; Hong *et al.*, 2002). Chez *Streptococcus intermedius*, la chondroïtinase AC lyase a été décrite comme jouant un rôle dans la dégradation des tissus de l'hôte (cerveau et foie chez l'homme) et donc dans la pénétration de l'agent infectieux, ainsi que dans l'apport d'éléments nutritifs pour la bactérie au niveau du site d'infection (Shain *et al.*, 1996). Chez *P. gingivalis*, une chondroïtinase a été clairement associée à la pénétration du pathogène au niveau de l'épithélium buccal (Smith *et al.*, 1997). Enfin, chez *V. vulnificus*, deux gènes codant des chondroïtinases ont été mis en évidence au niveau d'un îlot génomique de 33 kpb, l'îlot XII, caractéristique des souches de la lignée I mise en évidence par MLST (lignée correspondant au biotype I, constitué de souches pathogènes pour l'homme) (Cohen *et al.*, 2007) ; les auteurs ont avancé l'hypothèse que les gènes présents dans cet îlot génomique (et notamment les gènes codant les chondroïtinases), conféraient un avantage sélectif, du fait de l'apport en éléments nutritifs pour la bactérie *via* la dégradation des GAG notamment et d'un pouvoir pathogène accru.

- Différents gènes codant potentiellement des protéines impliquées dans d'adhésion et la colonisation de l'hôte :

**L'internaline** (clone SSH337) : cette protéine de surface décrite chez *Listeria monocytogenes* (un pathogène de l'homme entraînant de sévères infections du système nerveux central et de l'unité foeto-placentaire après passage de la barrière intestinale), est impliquée dans la colonisation intestinale en se fixant au niveau de protéines d'adhésion de l'hôte (la cadhérine-E), de façon à pénétrer dans les cellules épithéliales (Lecuit *et al.*, 2001 ; Liu *et al.*, 2007).

**Les protéines Tad B et Tad G** (respectivement clones SSH108 et SSH611) : les gènes *tad* (Tight Adherence) font partie d'un opéron *tadABCDEFG* appelé le WCI (Widespread Colonization Island), conservé dans nombre d'espèces bactériennes et qui codent la machinerie requise pour l'assemblage du pilus Flp (Fimbrial Low-molecular-weight Protein) (Tomish *et al.*, 2007). Les gènes *tad* sont impliqués dans la formation du biofilm bactérien ou dans la colonisation et apparaissent donc jouer un rôle important dans la virulence de nombreuses bactéries comme par exemple chez *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Kachlany *et al.*, 2000 et 2001 ; Planet *et al.*, 2003), ou dans les genres *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*), *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Caulobacter*, *Vibrio* et certainement d'autres.

**Le gène *wbf*** (clone SSH374) : chez *V. cholerae*, l'opéron *wbf* code pour l'antigène O139 et également pour une capsule polysaccharidique (Waldor *et al.*, 1994 ; Attridge *et al.*, 2001). Antigène et capsule sont impliqués dans la colonisation de l'hôte et peuvent également intervenir dans l'échappement au système immunitaire par conversion antigénique, comme dans le cas de la conversion antigénique O1 - O139 de *V. cholerae*.

**Un gène de biosynthèse de la capsule** (clone SSH486) : on l'a vu en introduction, la capsule est un mécanisme de défense de la bactérie permettant de résister aux phénomènes de « post-intériorisation » induits par les cellules phagocytaires de l'hôte, au cours desquels sont déclenchés des mécanismes immunitaires non spécifiques tels que la production d'espèces oxygénées réactives, d'enzymes lysosomiales ou encore de peptides antimicrobiens. Chez *V. vulnificus* par exemple, la capsule est un élément clé de la virulence pour les 3 biotypes décrits (Yoshida *et al.*, 1985; Simpson *et al.*, 1987 ; Oliver, 2006).

- **Une toxine type RTX** (Repeats in ToXin) : la famille des toxines RTX est très largement représentée chez les bactéries et a été retrouvée systématiquement dans le génome de toutes les espèces de *Vibrio* étudiées à ce jour. Ces toxines RTX provoquent la mort cellulaire des cellules cibles par un mécanisme d'apoptose ou de nécrose. Chez *V. cholerae*, une toxine RTX perturbe les processus de polymérisation de l'actine des cellules hôtes, menant ainsi à une perte de l'intégrité des jonctions adhérentes (Sheahan *et al.*, 2004). La banque SSH a permis de mettre en évidence un motif RTX retrouvé chez 45 clones différents (par exemple le clone SSH198). Une séquence présentant une forte homologie avec une protéine liant une hémolysine a par ailleurs été mise en évidence par la SSH (clone SSH203).

- **La cytotoxine Mcf** (clone SSH226): la toxine Mcf (Makes Caterpillars Floppy) a été décrite chez *Photobacterium luminescens*. Cette bactérie évolue au cours de son cycle de vie : elle est d'abord symbiotique d'un nématode entomo-pathogène, puis une fois l'insecte colonisé par le nématode, la bactérie est libérée et devient pathogène pour l'insecte (Daborn *et al.*, 2002). La toxine Mcf, apparaît jouer un rôle primordial dans la persistance de la bactérie au sein du nématode et dans la mort de l'insecte, probablement en liaison avec un phénomène d'apoptose observé tant au niveau des hémocytes qu'au niveau des cellules épithéliales de l'estomac. Le mode d'action de cette cytotoxine n'est pas à ce jour clairement élucidé.

- **Les microcystines** : il s'agit de toxines retrouvées chez plusieurs espèces de cyanobactéries, dont *Microcystis* sp. et particulièrement *M. aeruginosa* (Nishizawa *et al.*, 1999). Les microcystines sont produites par le complexe « microcystine synthetase », composé de peptides synthetases et de polyketide synthases, codées par l'opéron *mcyA-J* (Schatz *et al.*, 2007). La séquence du clone SSH458 présente une E-value significative avec le produit du gène *mcyA* contenu dans cet opéron. Cependant,

dans le cas de *V. nigrispulchritudo* SFn1, aucune activité de type cyanotoxine n'a été retrouvée dans les surnageants de culture *in vitro* ; il resterait à rechercher une activité cyanotoxique *in vivo* (Cécile Bernard, MNHN Paris, communication personnelle).

- **Facteur de virulence *mviN*** (clone SSH164) : ces protéines ont été associées à la virulence dans d'autres genres bactériens sans pour autant être clairement caractérisées : chez *S. typhimurium* le gène codant le facteur MviN, est adjacent à l'opéron *flg* (codant le flagelle) et apparaît indispensable à la virulence (Carsiotis *et al.*, 1989) ; chez *B. pseudomallei*, un homologue de la protéine MviN de *S. typhimurium*, a été associé à la survie et à la virulence du pathogène (Ling *et al.*, 2006) ; chez *Rhizobium tropici*, un phytopathogène, un homologue de *mviN* a été associé à la motilité de la bactérie, mais pas à la virulence (O'Connell *et al.*, 1998).

- **Un récepteur membranaire pour un sidérophore** présentant une E-value significative avec la vulnibactine (clone SSH106). Dans un milieu limitant en fer, les bactéries ont développé un système capable de chélater les ions ferriques Fe<sup>3+</sup> avec une grande affinité : il s'agit des sidérophores et de leur système de transport. Ces systèmes apparaissent cruciaux pour la colonisation et la multiplication de la bactérie au sein de l'hôte (Crosa et Walsh, 2002).

## II.2 Corrélation entre marqueurs génétiques et statuts de virulence

L'analyse des profils d'hybridation en macro-array, a permis de mettre en évidence une corrélation entre certains marqueurs génétiques issus de la SSH et les trois statuts de virulence : 78 fragments d'ADN ont été sélectionnés lors d'un premier criblage réalisé entre l'ensemble des fragments issus de la SSH et les 24 souches typées par MLST. La distribution de ces 78 fragments d'ADN a ensuite été validée sur les 34 autres souches de la collection typées par AP-PCR (Tableau 4) faisant apparaître une même corrélation entre marqueurs génétiques sélectionnés et pathotypes :

- 13 fragments d'ADN apparaissent spécifiques des souches HP du groupe phylogénétique A : 95,1% de signaux d'hybridation positifs sont obtenus avec les 19 souches HP, alors que 7,7% sont observés avec les souches MP du groupe A et aucun signal positif pour les souches du groupe B et les souches NP.

- 55 fragments d'ADN sont spécifiques des souches du groupe phylogénétique A (HP et MP), avec 94,1% de signaux positifs pour ces marqueurs et seulement 3% pour les autres souches.

- 10 fragments d'ADN sont spécifiques des souches des groupes A et B quel qu'en soit le pathotype, avec 98,7% de signaux positifs pour ces marqueurs et seulement 11,5% pour les autres souches NP.



## II.3 Marqueurs génétiques d'intérêt identifiés par macro-array (Tableaux 5 et 6, Figure 40)

### II.3.1 Gènes potentiellement associés à la virulence

Parmi les gènes identifiés en SSH et codant potentiellement des **protéines associées à la virulence** (Tableau 3), 5 ont été retrouvés en macro-array présents uniquement dans l'ensemble des souches virulentes du groupe phylogénétique A : il s'agit des gènes codant potentiellement un récepteur de sidérophore (clone SSH106), d'une toxine RTX (clone SSH198), d'une chondroïtinase (clone SSH216), d'une toxine de type microcystine (clone SSH458) et enfin d'une capsule (clone SSH486).

### II.3.2 Fragments d'ADN présentant la signature d'éléments génétiques mobiles

- **Eléments plasmidiques** : la « serine peptidase S49 » (clone SSH16), potentiellement associée à des mécanismes de maturation de protéines, est spécifique des souches HP du groupe phylogénétique A. Ce fragment d'ADN présente par ailleurs, une très forte E-Value en BlastN ( $9,00E^{-175}$ ) avec un fragment d'ADN ZZZ3 décrit dans un plasmide de 13,5 kpb de *V. shilonii*, souche AK1. Deux autres fragments d'ADN (clones SSH68 et SSH155) présentent également une forte E-Value en BlastN (respectivement  $7,00E^{-57}$  et  $5,00E^{-86}$ ) avec un fragment Z8 identifié dans ce même plasmide de *V. shilonii* AK1.

- **Eléments à signature phagique** : trois fragments d'ADN spécifiques des souches HP du groupe phylogénétique A (clones SSH191, SSH302 et SSH522), présentent une E-Value significative avec des gènes codant des protéines constitutives ou régulatrices de la queue de phages. Un autre fragment d'ADN spécifique des souches HP et MP du groupe A (clone SSH196) code pour une intégrase de phage.

- **Eléments type transposase IS** (Insertion Sequence) : six transposases putatives ont été mises en évidence parmi les fragments d'ADN spécifiques des souches HP et MP du groupe phylogénétique A, parmi lesquelles la transposase ISSod3 (clones SSH 135 et SSH197), la transposase IS4 (clone SSH206), la transposase ISPsy9 (clones SSH 273 et SSH351) et enfin la protéine de transposition C Tn7-like (clone SSH 536).

### II.3.3 COG inconnus et protéines hypothétiques conservées

Parmi les 186 fragments d'ADN séquencés dans la SSH correspondant à des gènes codant des protéines hypothétiques conservées ou à des séquences analysées comme COG inconnus, 27 sont retrouvés en macro-array : 11 correspondent aux protéines hypothétiques et 16 à des COG inconnus. Parmi ces fragments d'ADN non caractérisés pourraient se trouver un certain nombre de gènes codant des facteurs de virulence spécifiques de la souche SFn1. Les progrès en terme de caractérisation

fonctionnelle de nouveaux ORFs dans les banques de données permettront dans le futur de diminuer cette part de COG inconnus et de protéines hypothétiques conservées.

	SSH clone	Genbank accession N°	SSH DNA fragment size (bp)	predicted protein (bp)	homology	blast	E value	identity (%)	homologue accession N°	
specific DNA fragments of the HP strains	16	ET024018	459	990	<b>13.5 kbp plasmid sequence Z2Z3, putative serine peptidase S49 [Vibrio shilonii AK1]</b>	n	9,00E-175	92	AAB65791	
	64	ET023962	427	1380	hypothetical protein VV0144 [Vibrio vulnificus YJ016]	x	6,00E-76	97	NP_932937	
	68	ET024019	250	553	<b>13.5 kbp plasmid sequence Z8</b>	n	7,00E-57	94	AF009903	
	104	ET023965	415	2691	hypothetical protein Neut_2547 [Nitrosomonas eutropha C71]	x	2,00E-48	72	ABI60750	
	155	ET024020	312	553	<b>13.5 kbp plasmid sequence Z8 [Vibrio shilonii AK1]</b>	n	5,00E-86	88	AF009903	
	191	ET024021	323	1788	predicted phage tail protein [Vibrio vulnificus]	x	2,00E-05	45	ABB90701	
	284	ET024022	262	1035	hypothetical protein R2601_22861 [Roseovarius sp. HTCC2601]	x	5,00E-04	55	ZP_01444696	
	302	ET024023	367	2280	Phage tail tape measure protein TP901, core region [Thiomicrospira crunogena XCL-2]	x	4,00E-16	40	YP_390968	
	378	ET024024	277	-	Unknown COG	x	-	-	-	
	414	ET024025	537	-	Unknown COG	x	-	-	-	
	506	ET024007	405	909	Predicted transcriptional regulator [Vibrio alginolyticus 12G01]	x	2,00E-05	47	ZP_01259885	
	522	ET024026	405	1815	putative tail length determinant [Bacteriophage K139]	x	2,00E-13	35	NP_536663	
	535	ET024027	365	489	hypothetical protein pC46022_21, Vibrio vulnificus	x	3,00E-33	53	YP_001393180	
	specific DNA fragments of all the strains of the cluster A	39	ET023960	187	-	Unknown COG	x	-	-	-
		55	ET023961	416	765	tsaC, RSc2351; probable toluenesulfonate zinc-independent alcohol dehydrogenase oxidoreductase protein [Xanthobacter autotrophicus Py2]	x	6,00E-15	63	ZP_01196427
73		ET023963	429	1080	putative signal peptide protein [Marinomonas sp. MED121]	x	9,00E-42	59	ZP_01077543	
86		ET023964	331	1227	probable tartrate dehydrogenase/ 3-isopropylmalate dehydrogenase [Rhodococcus sp. RHA1]	x	1,00E-18	60	YP_708005	
106		ET023966	255	2061	<b>vulnibactin outer membrane receptor precursor [Vibrio vulnificus]</b>	x	3,00E-15	56	AAF28471	
116		ET023967	322	1143	hypothetical protein VP1567 [Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210633]	x	1,00E-06	68	NP_797946	
129		ET023968	344	-	Unknown COG	x	-	-	-	
130		ET023969	366	906	ferrous iron efflux protein F [Vibrio cholerae O1 biovar eltor str. N16961]	x	6,00E-44	76	NP_232318	
135		ET023970	219	1038	<b>iSSod13, transposase [Vibrio vulnificus YJ016]</b>	x	1,00E-28	94	NP_934531	
154		ET023971	485	2058	ATPase involved in DNA repair-like protein [Shewanella frigidimarina NCIMB 400]	x	3,00E-41	70	YP_750769	
166		ET023972	375	-	Unknown COG	x	-	-	-	
173		ET023973	365	-	Unknown COG	x	-	-	-	
176		ET023974	347	3840	hypothetical protein CburD_01002029 [Coxiella burnetii Dugway 7E9-12]	x	3,00E-12	45	ZP_01298115	
196		ET023975	389	1539	Phage integrase [Thiomicrospira crunogena XCL-2]	x	1,00E-17	44	YP_390599	
197		ET023976	372	1038	<b>iSSod13, transposase [Vibrio vulnificus YJ016]</b>	x	7,00E-67	95	NP_934531	
198		ET023977	336	8811	<b>RTX protein or Autotransporter adhesin [Vibrio vulnificus CMCP6]</b>	x	2,00E-07	42	NP_761533	
205		ET023978	450	894	glutamyl-tRNA synthetase [Chromobacterium violaceum ATCC 12472]	x	5,00E-31	50	NP_903103	
214		ET023979	355	5874	conserved hypothetical protein, putative DNA helicase [Desulfotribium vulgaris subsp. vulgaris DP4]	x	7,00E-11	48	ZP_01458409	
216		ET023980	480	2034	<b>Chain A, Chondroitinase Ac Lyase [Flavobacterium Heparinum]</b>	x	7,00E-09	24	ICB8_A	
227		ET023981	414	498	GCN5-related N-acetyltransferase [Psychromonas ingrahamii 37]	x	7,00E-21	57	ZP_01350703	
260		ET023982	432	732	hypothetical protein P3TCK_08758 [Photobacterium profundum 3TCK]	x	1,00E-05	89	P3TCK_08758	
269		ET023983	403	1071	transposase, IS4 [Shewanella baltica OS195]	x	8,00E-17	73	ZP_01432822	
273		ET023984	367	801	Unknown COG	x	-	-	-	
278		ET023985	369	951	<b>ISPs9, transposase OrfB [alpha proteobacterium HTCC2255]</b>	x	2,00E-33	68	ZP_01448232	
289		ET023986	449	1947	peptide ABC transporter, permease protein [Brucella abortus biovar 1 str. 9-941]	x	2,00E-24	45	YP_223694	
293		ET023987	447	-	putative epimerase/dehydratase [Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210633]	x	4,00E-77	96	NP_796614	
318		ET023988	506	1194	Unknown COG	x	-	-	-	
320		ET023989	281	1080	putative ABC transporter [Actinobacillus actinomycetemcomitans]	x	3,00E-22	33	BAA82537	
342		ET023990	383	510	Binding-protein-dependent transport systems inner membrane component [Psychromonas ingrahamii 37]	x	5,00E-14	62	ZP_01350492	
348		ET023991	348	1530	hypothetical protein PPRB0091 [Photobacterium profundum SS9]	x	3,00E-40	62	YP_131764	
351		ET023992	365	801	deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase [Photobacterium profundum SS9]	x	7,00E-32	60	YP_130718	
368		ET023993	517	1227	<b>ISPs9, transposase OrfB [alpha proteobacterium HTCC2255]</b>	x	2,00E-20	61	ZP_01449847	
376		ET023994	436	10947	2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit [Oceanicoccus alexandrii HTCC2633]	x	6,00E-36	54	ZP_00953146	
384		ET023995	319	1164	alpha-aminoadipyl-L-cysteine-D-valine synthetase [Amycolatopsis lactamdurans]	x	6,00E-20	40	CAA40561	
417		ET023996	333	1143	nuclotide sugar dehydrogenase [Vibrio vulnificus]	x	6,00E-42	96	AAO32664	
424		ET023997	323	-	hypothetical protein VP1567 [Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210633]	x	2,00E-07	37	NP_797946	
430		ET023998	372	-	Unknown COG	x	-	-	-	
431		ET023999	227	1155	Unknown COG	x	-	-	-	
439		ET024000	421	1056	putative acyl-CoA dehydrogenase [Oceanospirillum sp. MED92]	x	4,00E-25	72	ZP_01165327	
458		ET024001	252	8361	putative ATP-binding ABC transporter [Rhizobium leguminosarum bv. viciae 3841]	x	1,00E-30	47	CAK10505	
461		ET024002	284	2343	<b>mcvA [Microcystis aeruginosa]</b>	x	1,00E-14	54	BAA83992	
476		ET024003	439	6348	organic solvent tolerance protein [Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210633]	x	9,00E-37	72	BAC58602	
486		ET024004	481	1023	putative non-ribosomal peptide synthetase [Erwinia carotovora subsp. atroseptica SCRI1043]	x	3,00E-22	44	YP_048600	
490		ET024005	444	-	<b>capsule biosynthesis protein capA [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482]</b>	x	4,00E-14	50	NP_810259	
505		ET024006	468	2022	Unknown COG	x	-	-	-	
507		ET024008	384	-	methyl-accepting chemotaxis protein [Cobwellia psychrerythraea 34H]	x	3,00E-23	54	YP_270583	
526		ET024009	482	1035	Unknown COG	x	-	-	-	
541		ET024010	422	5835	PTS system N-acetylgalactosamine-specific IID component [Symbiobacterium thermophilum 1AM 14863]	x	3,00E-30	53	YP_075076	
553		ET024011	369	2157	unknown [Pseudomonas syringae pv. syringae]	x	8,00E-33	51	AAK83337	
563		ET024012	374	1434	probable toxin transporter [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	x	4,00E-38	66	AAG07530	
566		ET024013	404	942	<b>Tn7-like transposition protein C [Shewanella baltica OS155]</b>	x	3,00E-34	60	ZP_00584340	
595		ET024014	395	2145	hypothetical protein OS145_02860 [Idiomarina baltica OS145]	x	4,00E-13	52	ZP_01041994	
617		ET024015	191	-	type III restriction enzyme, res subunit [Shewanella frigidimarina NCIMB 400]	x	3,00E-32	65	YP_750771	
618		ET024016	230	888	Unknown COG	x	-	-	-	
622		ET024017	390	1124	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase [Marinomonas sp. MED121]	x	6,00E-17	60	ZP_01075946	
					hypothetical protein V12B01_04853 [Vibrio splendidus 12B01]	x	7,00E-32	79	ZP_00990364	

Tableau 5: Analyse des fragments d'ADN issus de la SSH qui sont spécifiques des souches HP du groupe phylogénétique A et de l'ensemble des souches HP et MP du groupe A. Les gènes codant des protéines potentiellement impliquées dans la virulence, sont indiqués en caractère gras, les éléments à signature plasmidique en rouge, les éléments à signature phagique en jaune, les éléments correspondant à des transposases IS (Insertion Sequence) en gris

	SSH clone	SSH DNA fragment size (bp)	predicted protein (bp)	homology	E value	identity (%)	homologue accession N°
specific DNA fragments of the virulent strains of the cluster A and B	101	325	993	probable 2-dehydro-3-deoxygalactokinase protein [Ralstonia solanacearum GM11000]	5,00E-15	44	NP_520880
	134	203	–	Unknown COG	–	–	–
	138	266	948	Periplasmic binding protein/LacI transcriptional regulator [Roseovarius sp. HTCC2601]	2,00E-26	80	ZP_01441797
	229	439	897	hypothetical protein epsilon15p35 [Enterobacteria phage epsilon15]	2,00E-06	28	NP_848243
	235	442	–	Unknown COG	–	–	–
	306	418	762	hypothetical protein [Streptomyces hygroscopicus subsp. hygroscopicus]	4,00E-17	39	CAF31832
	360	500	945	putative substrate binding component of ABC transporter [Rhizobium leguminosarum bv. viciae 3841]	6,00E-35	78	CAK11912
	432	492	1098	Alcohol dehydrogenase GroES-like protein [Chromohalobacter salexigens DSM 3043]	2,00E-13	80	YP_572420
	491	384	1014	putative ABC-type transporter, periplasmic component [Propionibacterium acnes KPA171202]	1,00E-15	29	YP_055047
	491	384	2913	UvrD/REP helicase [Nitrosomonas eutropha C71]	2,00E-19	48	ABI60748
	578	457	1551	COG1070: Sugar (pentulose and hexulose) kinases [Yersinia pseudotuberculosis IP 31758]	3,00E-42	60	ZP_00794868

Tableau 6: Analyse des fragments d'ADN issus de la SSH qui sont spécifiques des souches virulentes des groupes phylogénétiques A et B

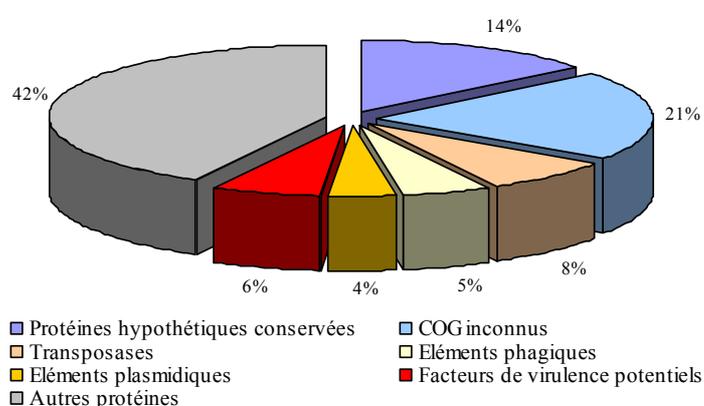


Figure 40: Fonctions hypothétiques des 78 fragments d'ADN sélectionnés à l'issue de la SSH et du macro-array

### III Discussion

La SSH a permis l'identification de 368 fragments d'ADN présents dans le génome de la souche *V. nigrispulchritudo* HP SFn1 mais absents du génome de la souche NP SFn118. Le criblage en macro-array avait pour but d'étudier la distribution de l'ensemble de ces fragments sur la collection de 58 souches de *V. nigrispulchritudo* de pathotypes connus. L'analyse en macro-array a ainsi permis de sélectionner 78 fragments d'intérêt parmi les 368 identifiés en SSH, sur la base de corrélations mises en évidence entre ces marqueurs génétiques, les groupes phylogénétiques identifiés par les typages MLST et AP-PCR et les statuts de virulence : 13 fragments d'ADN sont spécifiques des souches HP du groupe phylogénétique A ; 55 fragments d'ADN sont spécifiques des souches HP et MP du groupe phylogénétique A ; enfin, 10 fragments d'ADN sont spécifiques des souches des groupes A et B, quel qu'en soit le pathotype.

D'un point de vue diagnostique et pour des études épidémiologiques futures sur le Syndrome d'été, il convenait de disposer d'outils plus discriminants que la MLST ou l'AP-PCR, de façon à

pouvoir distinguer les deux pathotypes du groupe A, sans recours systématique à une caractérisation de la virulence d'un isolat bactérien par infection expérimentale. Les 13 fragments spécifiques des souches HP type Syndrome d'été permettent d'ores et déjà de différencier, au sein du groupe A, les souches HP des souches MP. Par ailleurs, ce même outil macro-array permet de différencier les souches HP type Syndrome d'été des souches HP du groupe phylogénétique B, c'est-à-dire des souches isolées dans un contexte de Syndrome 93 ou de vibriose opportuniste, puisque 10 fragments d'ADN se retrouvent à la fois dans les souches du groupe A et du groupe B. On notera cependant que des biais expérimentaux, au niveau de l'hybridation des membranes de macro-array et de leur révélation, peuvent aboutir à des erreurs de lecture des signaux positifs, certains spots pouvant être trop faiblement marqués ; l'utilisation d'un grand nombre de marqueurs génétiques, comme c'est le cas dans cette étude, permet globalement de pallier ces biais expérimentaux et de corrélérer les résultats de macro-array avec les groupes phylogénétiques et les statuts de virulence des souches étudiées. L'application de cet outil pour la caractérisation de la virulence et pour le typage d'autres isolats de *V. nigrripulchritudo* a déjà abouti à d'excellents résultats en Nouvelle-Calédonie. Le macro-array reste néanmoins relativement compliqué et lourd à mettre en œuvre, d'autant plus dans un contexte d'études épidémiologiques à l'échelle de la Nouvelle-Calédonie, où un grand nombre d'isolats se devraient d'être traités rapidement.

Une autre approche de type PCR, ou même PCR multiplex, ciblant des fragments d'ADN spécifiques de chaque groupe phylogénétique, pourrait apporter une réponse rapide, simple d'utilisation et fiable aux problèmes de diagnostic de *V. nigrripulchritudo* rencontrés en Nouvelle-Calédonie.

L'autre objectif majeur de cette étude concernait l'identification de gènes potentiellement impliqués dans la virulence. A l'issue du criblage en macro-array, seuls 5 gènes candidats ont été retenus participant au codage d'un sidérophore (clone SSH106), d'une RTX protéine (clone SSH198), d'une chondroïtinase (clone SSH216), d'une toxine de cyanobactérie type microcystine (clone SSH458) et enfin d'une protéine intervenant dans la biogenèse de la capsule polysaccharidique. Ces gènes ont été retrouvés dans l'ensemble des souches HP et MP du groupe phylogénétique A. Par contre, aucun gène candidat n'a été retrouvé uniquement chez les souches HP type Syndrome d'été.

Il est intéressant de noter que les autres gènes candidats à la virulence identifiés par SSH chez la souche SFn1 n'ont pas été retrouvés au sein de la collection de souches testées et semblent par conséquent spécifiques de la souche SFn1. Il est ainsi probable qu'en dehors d'un ensemble de gènes potentiellement impliqués dans la virulence, qui soit commun entre les souches HP et MP du groupe phylogénétique A, puisse exister un panel de gènes supplémentaires, également potentiellement impliqués dans la virulence mais spécifiques de souches, ou tout du moins, non partagés par l'ensemble des souches du même type et indispensables au déterminisme génétique de la virulence d'un même pathotype. Chez *V. cholerae*, certains facteurs de virulence sont retrouvés

systématiquement chez des souches hautement pathogènes responsables d'épidémies et sont qualifiés de facteurs de virulence « majeurs », comme par exemple la toxine CT ou le pilus TCP chez les souches appartenant aux sérogroupes O1 et O139. D'autres gènes peuvent coder des protéines participant à la virulence de ces mêmes sérogroupes, ou de sérogroupes moins pathogènes ou non responsables d'épidémies ; ces facteurs de virulence sont donc qualifiés « d'accessoires », caractérisant la variabilité des statuts de virulence de ces différents isolats bactériens. De même chez *V. nigrripulchritudo*, certains marqueurs de virulence apparaissent communément partagés par les souches HP du groupe phylogénétique A et pourraient donc être des constituants « majeurs » de la virulence de ces souches, indispensables à la pleine expression de la virulence et menant *in fine* aux mortalités massives de type Syndrome d'été ; d'autres facteurs de virulence « accessoires », par exemple ceux exclusivement identifiés chez SFn1 mais pas dans le reste de la collection, ou encore ceux partagés par les deux pathotypes du groupe phylogénétique A, pourraient moduler le pouvoir pathogène de ces souches.

Par ailleurs, 27 fragments d'ADN correspondant à des gènes codant des protéines hypothétiques conservées ou à des gènes référencés comme COG inconnus, ont été sélectionnés en macro-array. Certains de ces marqueurs génétiques, dont la fonction n'a pas été caractérisée dans d'autres modèles bactériens, pourraient coder des protéines impliquées dans la virulence.

Pour démontrer la fonction hypothétique d'un gène dans la virulence, des stratégies de génétique inverse doivent être développées pour chaque gène candidat et l'atténuation de la virulence évaluée en pathologie expérimentale. La complémentation du gène muté doit ensuite permettre de restituer le phénotype sauvage. Des expérimentations futures devraient être développées en ce sens sur des gènes d'intérêt, de façon à évaluer le poids de chacun de ces gènes dans la virulence. Le principe de ces approches et les premiers essais de mutagenèse seront présentés dans le chapitre III.

De nombreux fragments d'ADN présentant une signature d'éléments génétiques mobiles ont été sélectionnés par l'analyse macro-array : il s'agit de transposases, d'éléments phagiques et d'éléments plasmidiques. Ces éléments mobiles représentent au total 17% des 78 fragments d'ADN étudiés.

On l'a vu en introduction de ce chapitre, les stratégies SSH dans d'autres modèles bactériens, entre une souche Tester virulente et une souche Driver non virulente, ont permis l'identification de gènes potentiellement acquis par des mécanismes de HGT, dont des gènes de virulence. L'hypothèse avancée dans le chapitre I propose que des mécanismes de HGT pourraient être à l'origine d'une partie des gènes caractéristiques des souches HP de *V. nigrripulchritudo* du groupe A, permettant la distinction avec des souches MP du même groupe. Or, trois fragments d'ADN spécifiques des souches HP du groupe A (clones SSH16, SSH68 et SSH155), présentent de très fortes E-value en blastN, avec un plasmide de la souche *V. shilonii* AK1, au niveau des zones Z2Z3 et Z8 de ce plasmide. Par

ailleurs, trois autres fragments d'ADN également spécifiques des souches HP du groupe A (clones SSH 191, SSH302 et SSH522) présentent des homologies significatives avec des éléments phagiques structurels et de régulation de la queue de bactériophages. La présence de ces 6 éléments génétiques mobiles, parmi les 13 marqueurs génétiques des souches HP type Syndrome d'été, pose la question de l'existence d'un ou plusieurs réplicons caractéristiques de ces souches et permettant la distinction des deux pathotypes du groupe A. Des essais de purification d'ADN plasmidique avaient été développés sans succès préalablement à cette thèse sur un certain nombre de souches de *V. nigrispulchritudo*, à l'aide du protocole de référence de Kado et Liu (1981). Suite aux résultats encourageants de l'analyse en macro-array, il a été décidé de renouveler les essais de purifications de plasmides à l'aide d'autres protocoles ; les résultats sont présentés dans le chapitre suivant.

### **Conclusions et perspectives sur l'identification de marqueurs génétiques de la virulence de souches de *V. nigrispulchritudo* pathogènes**

L'identification de marqueurs génétiques de la virulence a permis la distinction entre les souches HP type Syndrome d'été, les souches MP du groupe phylogénétique A, les souches du groupe phylogénétique B et les souches NP. L'utilisation de l'approche macro-array comme outil diagnostique pour des études épidémiologiques du Syndrome d'été est d'ores et déjà applicable et constitue une technique de choix, fiable, hautement résolutive par rapport aux autres techniques de typage disponibles. Cependant l'approche macro-array est relativement lourde à mettre en œuvre ; d'autres approches plus simples vont être développées par PCR ciblant spécifiquement ces marqueurs.

L'approche SSH/macro-array a également permis l'identification de gènes candidats à la virulence, des COG inconnus, des protéines hypothétiques conservées et des éléments génétiques mobiles. L'ensemble de ces gènes pourrait coder des protéines associées à la virulence. L'identification de gènes de virulence potentiels n'est qu'un préalable à l'étude de la pathogénicité de souches bactériennes virulentes ; il convient de poursuivre par d'autres études afin d'éclairer la pathogénicité des souches de *V. nigrispulchritudo* type Syndrome d'été :

- Des **stratégies de génétique inverse** doivent être développées pour chaque gène candidat et l'atténuation de la virulence testée en infection expérimentale. La complémentation du gène muté doit ensuite restituer le phénotype sauvage, en l'occurrence la virulence.
- L'identification certaine d'un gène de virulence n'est pas suffisante dans la compréhension de la pathogénie : **l'expression des gènes** peut en effet être modulée par un ensemble de facteurs qu'il convient d'évaluer. Cette expression pourra être étudiée *in vivo* (hybridation *in situ*) ou *ex vivo* (Northern blot, PCR quantitative) et devrait apporter des informations sur les voies d'infection de l'hôte, sur la pathogénèse et enfin d'identifier les paramètres biotiques et abiotiques modulant la virulence.

Comme indiqué dans la discussion dans ce chapitre, 6 des 13 fragments spécifiques des souches HP du groupe phylogénétique A présentent des homologies significatives avec des éléments génétiques mobiles, type plasmide et phage. Si des essais préliminaires n'avaient pas permis la purification d'ADN plasmidique de souches de *V. nigripulchritudo* à partir du protocole de référence de Kado et Liu (1981), au vu des résultats de l'analyse macro-array, il a tout de même été décidé de réitérer ces essais de purification, à partir d'autres protocoles commerciaux. C'est l'objet du chapitre qui suit.

L'ensemble des résultats de ce chapitre II et du chapitre III, a fait l'objet d'un article accepté dans *Applied and Environmental Microbiology* et présenté en annexe 3 .



---

## CHAPITRE III

Mise en évidence d'un plasmide marqueur de  
la virulence pour *L. stylirostris* chez  
*V. nigripulchritudo* : pSFn1

---

## Sommaire du chapitre III

<b>Introduction</b>	<b>119</b>
I Matériels et méthodes	119
I.1 Purification d'ADN plasmidique	119
I.2 Séquençage des plasmides pSFn1 et pAK1 en « shot-gun »	120
I.3 Analyse des séquences	121
I.4 Caractérisation des plasmides purifiés dans la collection de souches de <i>V. nigripulchritudo</i>	121
I.5 Transfert du plasmide pSFn1 à des souches MP et NP de <i>V. nigripulchritudo</i> par conjugaison	122
I.5.1 Construction du vecteur plasmidique pSFn1-pUC18-pSW25T	122
I.5.2 Conjugaison	124
I.5.3 Courbe de croissance des transconjugants et maintien du plasmide pSFn1 chez les transconjugants sans pression de sélection antibiotique	124
I.5.4 Infections expérimentales de <i>L. stylirostris</i> avec les transconjugants injectés en intra-musculaire	124
II Résultats	125
II.1 Identification et organisation génétique du plasmide pSFn1	125
II.2 Identification et caractérisation de plasmides dans une collection de souches de <i>V. nigripulchritudo</i>	126
II.3 Séquençage du plasmide pAK1 et analyse synténique entre les deux plasmides pSFn1 et pAK1	127
II.4 Les transconjugants <i>V. nigripulchritudo</i> /pSFn1-pUC18-pSW25T	129
II.5 Infections expérimentales par injection intra-musculaire de <i>L. stylirostris</i> par les transconjugants	130
III Discussion	132
<b>Conclusion</b>	<b>138</b>

## Mise en évidence d'un plasmide marqueur de la virulence pour *L. stylirostris* chez *V. nigripulchritudo* : pSFn1

### Introduction

A l'issue de l'analyse en macro-array, 13 fragments d'ADN ont été associés spécifiquement aux souches de *V. nigripulchritudo* HP de type Syndrome d'été ; 3 de ces fragments présentent une homologie significative avec des éléments phagiques ; 3 autres fragments trouvent des homologues avec les fragments Z2Z3 et Z8 d'un plasmide de *V. shilonii* AK1, un *Vibrio* associé au blanchiment du corail *O. patagonica* en Méditerranée (Rosenberg et Falkovitz, 2004). Ces 6 fragments laissent donc supposer la présence d'un ou plusieurs réplicons (plasmide, phage, ou une fusion des deux) qui pourraient être spécifiques des souches HP du groupe phylogénétique A. Or, comme on l'a vu en introduction de ce manuscrit, les éléments génétiques mobiles sont décrits dans la littérature comme pouvant conférer à une bactérie des facteurs de virulence. L'hypothèse de cette étude est que la distinction entre les deux pathotypes HP et MP du groupe A peut reposer en partie sur l'acquisition d'un ou de réplicon(s) par les souches HP, augmentant leur virulence par rapport aux souches MP ; cet évènement de HGT pourrait coïncider avec l'émergence des souches HP responsable des mortalités associées au Syndrome d'été.

Des travaux précédents visant à isoler des plasmides des souches de *V. nigripulchritudo* au moyen du protocole classique décrit par Kado et Liu (1981) ayant échoué (Goarant, communication personnelle), différentes techniques basées sur l'utilisation de kits commerciaux ont été testées. Le réplicon extrait a ensuite été entièrement séquencé, puis transféré dans une collection de souches de *V. nigripulchritudo* MP et NP par conjugaison ; la virulence des transconjugants ainsi constitués, a ensuite été testée en infection expérimentale.

### I Matériels et méthodes

#### I.1 Purification d'ADN plasmidique

Dans cette étude, 4 protocoles d'extraction ont été testés à partir de kit commerciaux conçus pour l'extraction d'ADN plasmidique de *Escherichia coli*, selon les instructions fournies : Qiafilter Plasmid Midi kit (Qiagen), Plasmid Midiprep kit (Sigma), Wizard DNA Purification System (Promega) et Fast Plasmid Mini Kit (Eppendorf).

Les essais d'extraction d'ADN plasmidique ont porté sur l'ensemble des souches de *V. nigripulchritudo* isolées en Nouvelle-Calédonie et typées par MLST dans le chapitre I, ainsi que sur la souche de *V. shilonii* AK1 isolée en Méditerranée (CIP107136<sup>T</sup>).

## I.2 Séquençage des plasmides pSFn1 et pAK1 en « shot-gun »

Le plasmide pSFn1 extrait de la souche HP SFn1, a été digéré partiellement par l'enzyme de restriction *Sau*IIIa : pour cela, 10 séries de digestion de 1 µg de plasmide ont été réalisées en tampon 1x et dans un volume total de 10 µl en diluant *Sau*IIIa de deux en deux, à partir de 10 unités initiales ; l'ensemble des tubes a été incubé 1 h à 37°C. Les ADN ainsi digérés ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,2 %. Les fragments d'ADN partiellement digérés de 3 à 8 kpb ont été prélevés et purifiés à l'aide du kit Qiaex II gel extraction kit (Qiagen), ligués dans le vecteur pUC18 préalablement linéarisé par *Bam*HI et déphosphorylé (Amersham Biosciences), pour permettre ensuite la transformation de souches TOP10 d' *E. coli* (Invitrogen), selon le protocole de clonage présenté dans le paragraphe I.4 du chapitre II. Les clones positifs comportant un insert ont été repiqués et amplifiés à l'aide du kit Templi Phi Amplification Kit (Amersham Biosciences). La réaction de séquence qui s'ensuit, a été réalisée selon le protocole décrit dans le paragraphe I.2.3 du chapitre I.

Pour le séquençage du plasmide de 13,5 kpb de *V. shilonii* AK1, une approche en shot-gun a également été développée, non pas directement à partir d'un extrait d'ADN plasmidique, mais à partir d'un plasmide ciblé obtenu par PCR inverse (PCRi), car la souche AK1 contient plusieurs plasmides (Rosenberg *et al.*, non publié). Deux PCRi ont donc été développées à partir de deux couples d'amorces déduites des séquences de pAK1 disponibles sous GenBank situées à différents endroits du plasmide : le mélange réactionnel pour un volume final de 50 µl, se compose de tampon de PCR 5x, de dNTPs à 0,25 mM chacun, d'amorces sens (pAK1-9F 5'-GGTCGATTCTGTTCATCCCGCC-3' ou pAK1-1F 5'-CTTGATTTACGTCCATAACAAACCTA-3') et anti-sens (pAK1-9R 5'-GCCAGAGATACGGGAGAGCCG-3' ou pAK1-1R 5'-AAAGAAGAAGATCGATAAGATGTGGAATG-3') à 0,25 µM, de 1 µl de d'ADN polymérase Herculase II fusion (Stratagene) et de 10 ng d'ADN plasmidique purifié de *V. shilonii* AK1. Les réactions de PCR ont été réalisées sur un thermocycleur PTC-100 (MJ research) : 2 min à 92°C ; 30 cycles de 30 s à 92°C, 1 min à Tm-5°C soit 63°C, 8 min à 68°C ; et une étape finale de 10 min à 68°C. Les étapes suivantes pour la digestion partielle *Sau*IIIa, le clonage dans TOP10 et la réaction de séquence, sont les mêmes que pour le séquençage du plasmide pSFn1 décrites plus haut.

### I.3 Analyse des séquences

L'assemblage des séquences en contigs a été réalisé à l'aide du logiciel SEQMAN (Lasergene software) en utilisant les paramètres par défaut.

L'annotation des plasmides permettant l'identification des ORFs potentiels a été effectuée en utilisant les logiciels GeneMark et ORF finder. Pour chaque ORF, la région promotrice putative ainsi que la région de Shine-Dalgarno (Shine et Dalgarno, 1975), c'est-à-dire le site de liaison des ribosomes (ou RBS pour Ribosome Binding Site) ont été localisées.

Les séquences obtenues ont été comparées avec les séquences issues de la base de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) à l'aide du logiciel Blast X (Altschul *et al.*, 1997). Seules les homologues de séquence ayant une E-value inférieure à  $10^{-5}$ , sont considérées comme significatives. Pour chaque plasmide, l'origine de répllication a été localisée sur la séquence à l'aide du logiciel DNA Strider.

Enfin l'analyse de la synténie permettant l'identification des régions présentant des identités significatives entre les deux plasmides pSFn1 et pAK1 a été réalisée avec le logiciel Artémis (Zouine, communication personnelle).

### I.4 Caractérisation des plasmides purifiés dans la collection de souches de *V. nigripulchritudo*

Les ADN plasmidiques extraits avec succès sur la collection de souches de *V. nigripulchritudo*, ont été digérés par les enzymes de restriction *EcoRI* ou *XhoI*, afin de les caractériser par RFLP. Pour cela, 2 µg d'ADN plasmidique ont été digérés en présence de tampon 10x avec 10 unités d'enzyme de restriction, pendant 1 h à 37°C.

Afin d'identifier la présence ou l'absence d'un fragment d'ADN homologue à celui de Z2Z3 du plasmide de 13,5 kpb de *V. shilonii* AK1 dans les plasmides isolés de souches de *V. nigripulchritudo*, les fragments d'ADN plasmidiques digérés par *EcoRI* ou *XhoI* ont été analysés par Southern-blot à l'aide d'une sonde marquée à la DIG, selon le protocole de Sambrook et Russel, 2001. Pour cela, les gels d'agarose ont été plongés 35 min dans un bain de tampon alcalin (0,4M NaOH, 1M NaCl) afin de dénaturer les ADN, qui ont ensuite été transférés sur une membrane Immobilon-Ny<sup>+</sup> (Millipore) sous vide (40 mbar) pendant 30 min, puis plongés 15 min dans un tampon « neutralisant » (0,5M Tris HCl, 1M NaCl, pH 7,2). Les membranes ont ensuite été hybridées avec une sonde correspondant à l'insert du clone SSH16 (fragment Z2Z3), marquée à la DIG (Roche Diagnostics) et générée par PCR. Les protocoles d'hybridation et d'immunorévélation, ont été détaillés dans le paragraphe I.5 du chapitre II.

## I.5 Transfert du plasmide pSFn1 à des souches MP et NP de *V. nigripulchritudo* par conjugaison

Le principe général de cette approche est de transférer par conjugaison le plasmide pSFn1 dans une souche de *V. nigripulchritudo* MP ou NP exempte de ce plasmide, de façon à tester si le plasmide joue un rôle dans la virulence. Le plasmide est transféré d'une souche donneuse de conjugaison, *E. coli* à une souche receveuse *V. nigripulchritudo*. Pour cela, il faut rajouter à pSFn1 trois éléments :

- Une origine de réplication oriV, nécessaire à la réplication dans les cellules compétentes *E. coli* : l'oriV est intégrée à pSFn1 par ligation avec le vecteur pUC18.
- Une origine de transfert oriT, indispensable à la conjugaison avec *V. nigripulchritudo* : l'oriT est intégrée à la construction pSFn1-pUC18 via le vecteur pSW25T.
- Enfin un gène de résistance à un antibiotique pour la sélection du transconjugant : pUC18 contient le gène ampR conférant la résistance à l'ampiciline et pSW25T le gène *aadA7*, conférant la résistance à la spectinomycine.

Le choix des souches de *V. nigripulchritudo* « receveuses » s'est porté sur deux pathotypes distincts : 5 souches MP appartenant au groupe phylogénétique A (ENn2, BLFn1, BLFn2, AQn1 et Wn13) ainsi que 2 souches NP (SFn118 et POn13). L'ensemble de ces expérimentations a été effectué dans l'Unité « Plasticité du Génome Bactérien » de l'Institut Pasteur de Paris, dirigée par Didier Mazel, au cours d'un stage de 6 mois.

### I.5.1 Construction du vecteur plasmidique pSFn1-pUC18-pSW25T (Figure 41)

Afin d'amplifier la totalité de pSFn1, une PCR inverse a été effectuée à partir d'ADN plasmidique extrait de la souche SFn1. Deux amorces ont été dessinées pour la PCRi, à partir de la séquence totale du plasmide, dans une région *a priori* non codante juste en aval de l'ORF 4, c'est-à-dire, l'ORF codant potentiellement « le phage tail measure protein » TP901. Il s'agit des amorces pSFn1BamHI-1F 5'-*CCCCCGGATCC*CTTGATTTACGTCCCATAACAAACCTA-3' et pSFn1BamHI-1R 5'-*CCCCCGGATCC*AAAGAAGAAGATCGATAAGATGTGGAATG-3'. A l'extrémité 5' de chaque amorce, un site BamHI (indiqué en italique) a été rajouté pour permettre la ligation du produit PCRi dans le vecteur pUC18 linéarisé par BamHI (2686 pb). Le mélange réactionnel de la PCRi ainsi que les cycles de PCR sont identiques à ceux appliqués pour l'amplification du plasmide pAK1 dans le chapitre III.

L'amplicon généré par PCRi a été prélevé sur gel d'électrophorèse, purifié à l'aide du kit Qiaex II gel extraction (Qiagen), digéré par l'enzyme BamHI puis ligué dans le vecteur pUC18 préalablement digéré par BamHI et déphosphorylé (Amersham Biosciences). Les cellules compétentes *E. coli* DH5 $\alpha$  ont ensuite été transformées avec cette construction pSFn1-pUC18, selon le protocole de clonage présenté dans le paragraphe I.4 du chapitre II et les clones criblés sur LB additionné

d'ampicilline (100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Les plasmides pSW25T (1963 pb) et pSFn1-pUC18 ont ensuite été digérés par *Sph*I et ligés ensemble pour créer le vecteur pSFn1-pUC18-pSW25T. Cette construction a ensuite été clonée dans les cellules compétentes *E. coli* DH5 $\alpha$  de façon à permettre son amplification, puis transformée dans les cellules donneuses  $\beta$ 2163 ( $\Delta$ dapA, auxotrophes pour le diaminopimélate) cultivées sur milieu LB additionné de DAP et d'ampicilline. Les souches d'*E. coli* et les plasmides utilisés dans cette étude sont présentés dans les tableaux 7 et 8.

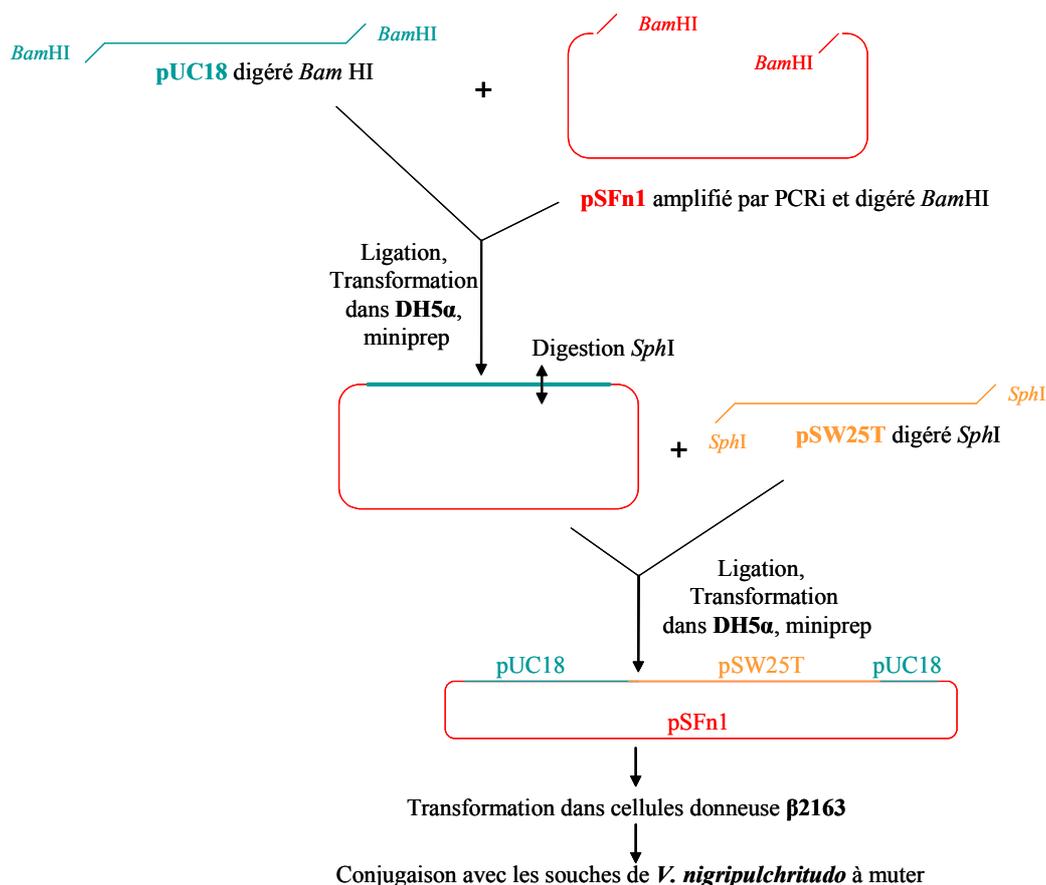


Figure 41: Principe de la construction du vecteur pSFn1-pUC18-pSW25T pour l'approche de conjugaison

Souches <i>E. coli</i>	Description	Référence
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> supE44 $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) $\Delta$ argF hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Demarre <i>et al.</i> , 2005
$\beta$ 2163	F <sup>-</sup> RP4-2-Tc::Mu $\Delta$ dapA::( <i>erm-pir</i> ) (Km <sup>r</sup> Em <sup>r</sup> )	Demarre <i>et al.</i> , 2005

Tableau 7: Souches de *E. coli* utilisées dans cette étude

Plasmide	Description	Référence
pUC18Bam HI	ori ColE1 (Ap <sup>r</sup> )	Pharmacia
pSW25T	pSW25::oriTRP4; [SpR]; oriVR6K $\gamma$	Demarre <i>et al.</i> , 2005

Tableau 8: Plasmides utilisés dans cette étude

### I.5.2 Conjugaison

Les suspensions bactériennes obtenues après une nuit d'incubation de la cellule donneuse  $\beta$ 2163 (possédant la construction pSFn1-pUC18-pSW25T) à 37°C et des 7 souches de *V. nigripulchritudo* receveuses à 27°C, ont été diluées cent fois dans du milieu LB et mises en culture à 30°C jusqu'à atteindre une densité optique (à 600 nm) de 0,3. Les conjugaisons ont été effectuées selon la méthode décrite par Biskri *et al.* (2005), avec un ratio cellules donneuses/cellules receveuses de 1/10. Les conjugaisons se sont déroulées sur la nuit sur filtre de 0,22  $\mu$ m incubés à 30°C sur un milieu gélosé LB additionné de DAP et de NaCl. La contre sélection des cellules donneuses  $\Delta$ dapA s'est effectuée sur du milieu LB dépourvu de DAP et additionné de NaCl (0,5 M) et d'ampicilline (100  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>). Les colonies résistantes ont ensuite été ré-isolées. Le transfert de la construction plasmidique pSFn1-pUC18-pSW25T a été contrôlé après extraction plasmidique par digestion enzymatique à l'aide des enzymes *Bam*HI, *Sph*I et *Eco*RI.

### I.5.3 Courbes de croissance des transconjugants et maintien du plasmide pSFn1 chez les transconjugants sans pression de sélection antibiotique

Pour chaque transconjugant, une courbe de croissance a été effectuée sur 48 h, avec addition ou non d'ampicilline (100  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>), en comparaison avec la souche sauvage correspondante et dans les mêmes conditions de culture.

Le maintien du plasmide dans les transconjugants cultivés 48h sans antibiotique a été contrôlé par isolement de 12 clones pour chaque transconjugant, puis extraction plasmidique sur chaque clone et digestion *Bam*HI.

### I.5.4 Infections expérimentales de *L. stylirostris* avec les transconjugants injectés en intra-musculaire

Le pouvoir pathogène des transconjugants a été testé en infection expérimentale par injection intramusculaire à différentes doses, selon le protocole décrit dans le paragraphe I.1.3 du chapitre I. Pour chaque transconjugant sont utilisés comme témoins la souche sauvage correspondante, la souche SFn1 ainsi que la souche SFn118. Par la suite chaque transconjugant sera nommé par le nom de la souche sauvage suivi de « pSFn1 ».

Les surnageants de culture ou ECP (Produits Extra Cellulaires) du transconjugant SFn118pSFn1 ont également été injectés de façon à tester leur toxicité. Les ECP sont issus de cultures en fin de phase exponentielle et sont obtenus par centrifugation puis filtration sur membrane à 0,22  $\mu$ m.

## II Résultats

### II.1 Identification et organisation génétique du plasmide pSFn1

Seul le Qiafilter Plasmid Midi kit (Qiagen) a permis la visualisation sur gel d'agarose d'un réplicon chez la souche HP SFn1.

Le plasmide nommé pSFn1 a été entièrement séquencé (numéro d'accèsion GenBank EU156059), sa taille est de 11237 pb et il contient 10 gènes putatifs. Une représentation graphique du plasmide annoté est présentée dans la figure 42. La comparaison des gènes putatifs, avec les gènes référencés dans la base de données GenBank en BlastX a permis d'assigner différentes fonctions aux protéines potentiellement codées par les ORFs identifiés. L'analyse de ces ORFs est présentée dans le tableau 9. Trois d'entre eux codent des gènes référencés comme COG inconnus (ORFs 1, 7 et 9), c'est-à-dire des gènes ne présentant pas d'homologies significatives avec des gènes déjà présents dans la base de données GenBank ; deux codent des protéines hypothétiques conservées (ORFs 3 et 8) ; un montre une très forte homologie avec un activateur de la protéine osmoprotectante ProP d'*Oceanospirillum* sp. (ORF 10); un montre une très forte homologie avec une peptidase de la famille S49 (ORF 6) ; deux montrent de très fortes homologies avec des éléments phagiques (ORFs 4 et 5) ; et enfin un autre montre une très forte homologie avec une ATPase impliquée dans la partition d'un plasmide de *Campylobacter upsaliensis* (ORF 2).

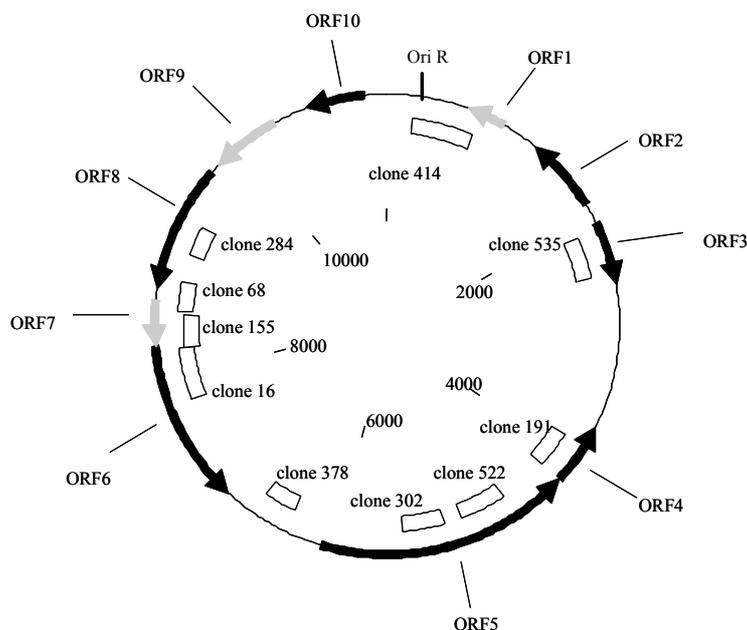


Figure 42: Représentation graphique du plasmide pSFn1 de la souche *V. nigripulchritudo* SFn1. L'orientation des ORFs putatifs est indiquée par l'orientation des flèches ; en noir, les ORFs présentant une homologie significative en Blast X avec des séquences référencées dans GenBank ; en gris, les ORFs putatifs ne présentant pas d'homologie significative avec des séquences connues. La localisation des fragments d'ADN identifiés par SSH est indiquée par les rectangles blancs

Numéro ORF	Taille ORF (pb)	Taille de l'homologue (pb)	Homologue	E value	Identité (%)	Numéro d'accèsion de l'homologue
1	308	–	COG inconnu	–	–	–
2	597	657	ATPase involved in partitioning protein, <i>Campylobacter upsaliensis</i> RM3195	3,00E-21	35	ZP_00371922
3	500	489	hypothetical protein pC46022_21, <i>Vibrio vulnificus</i>	6,00E-48	54	YP_001393180
4	486	2835	Phage tail tape measure protein TP901, <i>Delftia acidovorans</i> SPH-1	0.006	29	ZP_01581476
5	2007	3633	Phage tail tape measure protein TP901, core region, <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G20	1,00E-61	31	YP_387430
6	1305	963	Peptidase S49 <i>Nitrosospira multiformis</i> ATCC 25196 ou fragment Z2Z3 du plasmide <i>Vibrio shilonii</i> AK1	5,00E-42	37	YP_410758
7	363	–	COG inconnu	–	–	–
8	1014	996	hypothetical protein ebA7259, <i>Thiomicrospira crunogena</i> XCL-2	2,00E-52	38	YP_390952
9	548	–	COG inconnu	–	–	–
10	465	414	activator of ProP osmoprotectant transporter, <i>Oceanospirillum</i> sp. MED92	7,00E-08	33	ZP_01166131

Tableau 9: Analyse de la séquence des ORFs putatifs identifiés sur pSFn1

Parmi les 13 fragments d'ADN identifiés par SSH et spécifiques des souches HP du groupe phylogénétique A, 10 sont localisés sur le plasmide pSFn1 (Figure 42 et Tableau 5). Seuls les clones SSH64, SSH104 et SSH506 doivent être localisés au niveau chromosomique.

## II.2 Identification et caractérisation de plasmides dans une collection de souches de *V. nigrripulchritudo*

La présence de plasmide a ensuite été recherchée dans l'ensemble des souches de la collection typée par MLST.

Il apparaît que la totalité des souches HP appartenant au groupe phylogénétique A, soit quatre autres souches, présentent également un plasmide. Seules 4 souches supplémentaires de la collection portent également un ou plusieurs plasmides : il s'agit des souches AQn1 (MP groupe A), AMn3, AM102 (HP groupe B) et AgMn1 (NP).

L'analyse en RFLP a été conduite à l'aide des enzymes de restriction *EcoRI* or *XhoI* sur l'ensemble des plasmides. D'après l'analyse des profils de restriction, il apparaît que les 5 souches HP du groupe phylogénétique A dont SFn1 portent un plasmide identique ou très proche de pSFn1 (Tableau 10) : les profils de restriction sont en effet identiques avec 3 mêmes fragments issus de la digestion avec *EcoRI* (1,1, 3,4 et 6,6 kpb) et un fragment unique généré par *XhoI* correspondant à la linéarisation du plasmide (Figure 43). Les profils théoriques déduits de la séquence nucléotidique de pSFn1 concordent avec les profils observés par RFLP de ces souches.

Par contre, les profils RFLP générés à partir des plasmides extraits chez les 4 autres souches n'appartenant pas aux souches HP du groupe phylogénétique A, sont clairement différents de ceux obtenus avec pSFn1.

Les hybridations en Southern blot entre les plasmides extraits et la sonde Z2Z3 (clone SSH16) marquée à la DIG montrent que seuls les plasmides des souches HP du groupe phylogénétique A

contiennent le fragment ZZZ3, localisé au niveau du fragment digéré par *EcoRI* de 3,4 kpb, validant les résultats obtenus par macro-array en utilisant l'ADN total et présentés dans le chapitre II.

	souches HP du groupe phylogénétique A				souches MP du groupes phylogénétique A				souches du groupe phylogénétique B				souches NP										
	SFn1	SFn127	SFn135	POn3	POn19	AQn1	Wn1	Wn3	Wn13	BLFn1	ENn2	SO65	AM115	AMn3	AM102	AgMn1	POn4	POn12	POn13	SFn115	SFn118	Fn2	SVn3
plasmide (s)																							
signal ZZZ3 en southern blot																							

Tableau 10: Identification d'un ou plusieurs plasmides dans la collection de souches de *V. nigrispulchritudo* typées par MLST et résultats d'hybridation en Southern blot entre les plasmides extraits et la sonde ZZZ3 marquée à la DIG (résultats positifs en gris)

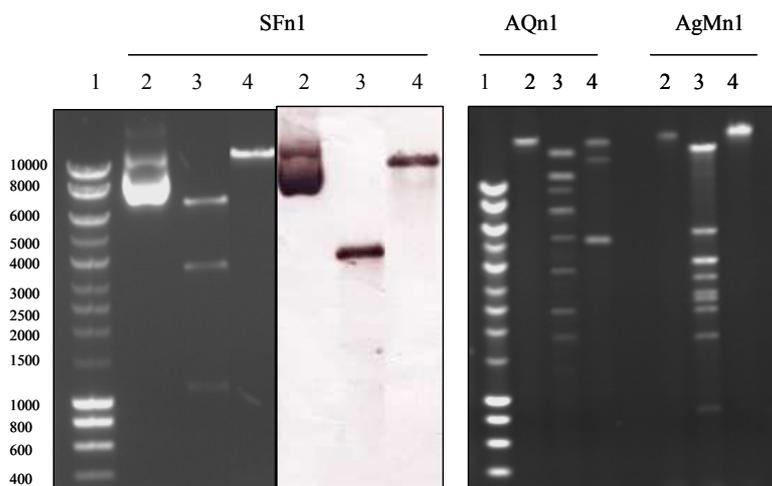


Figure 43: Profils de restriction *EcoRI*, *XhoI* des plasmides de SFn1 ; AQn1 et AgMn1 et hybridation en Southern blot entre pSFn1 et la sonde ZZZ3 marquée à la Digoxynénine. 1: marqueur moléculaire (pb). 2 : plasmides. 3 et 4 : respectivement profils de restriction *EcoRI* et *XhoI*. Les sites de restriction *EcoRI* déduits de la séquence de pSFn1 sont en position 1053 pb, 7707 pb et 11168 pb et pour *XhoI* à 10979 pb

### II.3 Séquençage du plasmide pAK1 et analyse synténique entre les deux plasmides pSFn1 et pAK1

Plusieurs plasmides ont été purifiés de la souche de *V. shilonii* AK1. Afin de cibler spécifiquement le plasmide d'intérêt, c'est-à-dire le plasmide de 13,5 kpb présentant des séquences extrêmement proches des fragments d'ADN SSH16, SSH68 et SSH155, deux PCRi ont été développées à deux endroits du plasmide à l'aide d'amorces spécifiques. Le plasmide d'intérêt a été amplifié en générant l'amplicon de taille attendue puis entièrement séquencé (numéro d'accèsion GenBank EU159455). Le plasmide nommé pAK1 a une taille de 13415 pb. Une représentation graphique du plasmide annoté est présentée dans la figure 44. L'analyse de ces ORFs est présentée dans le tableau 11 : comme pour pSFn1, dix ORFs putatifs ont ainsi été mis en évidence. Parmi ces ORFs, deux codent des gènes référencés comme COG inconnus (ORFs 7 et 9) ; quatre codent des protéines hypothétiques conservées (ORFs 3, 8, 12 et 13) ; un présente une forte homologie avec un activateur de la protéine osmoprotectante ProP d'*Oceanospirillum* sp. (ORF 10) ; un présente une forte

homologie avec une peptidase de la famille S49 (ORF 6) ; un présente une forte homologie avec des éléments phagiques (ORF 11) ; et enfin un présente une forte homologie avec une ATPase impliquée dans la partition d'un plasmide d'*E. coli* (ORF 2).

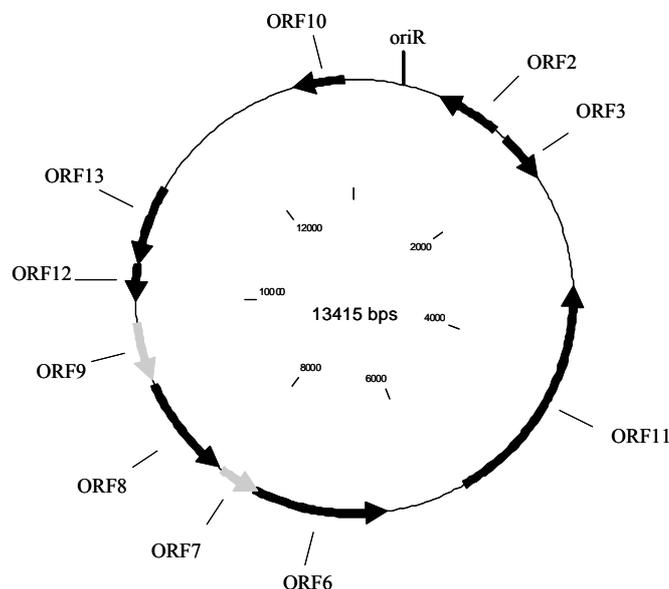


Figure 44: Représentation graphique du plasmide pAK1 de la souche *V. shilonii* AK1. L'orientation des ORFs putatifs est indiquée par l'orientation des flèches ; en noir, les ORFs présentant une homologie significative en Blast X avec des séquences référencées dans GenBank ; en gris les ORFs putatifs ne présentant pas d'homologie significative avec des séquences connues

Numéro ORF	Taille ORF (pb)	Taille de l'homologue (pb)	Homologue	E value	Identité (%)	Numéro d'accèsion de l'homologue
2	597	214	ATPases involved in chromosome partitioning, Escherichia coli	3,00E-14	30	YP_308779
3	500	163	hypothetical protein pC46022_21, Vibrio vulnificus	6,00E-48	54	YP_001393180
11	2319	760	Phage tail tape measure protein TP901, core region, Thiomicrospira crunogena XCL-2	4,00E-65	26	YP_390968
6	1305	299	peptidase S49, Methylobacterium chloromethanicum CM4	5,00E-44	38	ZP_02056078
7	362	—	COG inconnu	—	—	—
8	1014	332	hypothetical protein Tcr_0682, Thiomicrospira crunogena XCL-2	1,00E-56	38	YP_390952
9	509	—	COG inconnu	—	—	—
12	750	246	hypothetical protein VSAK1_26360, Vibrio shilonii AK1	1,00E-133	100	ZP_01869194
13	300	100	hypothetical protein VSAK1_26365, Vibrio shilonii AK1	1,00E-50	100	ZP_01869195
10	468	138	activator of ProP osmoprotectant transporter, Oceanospirillum sp. MED92	1,00E-06	32	ZP_01166131

Tableau 11: Analyse de la séquence des ORFs putatifs identifiés sur pAK1

L'analyse de la synténie des deux plasmides pSFn1 et pAK1 met en évidence une grande homologie entre ces deux éléments mobiles : 93% d'identité nucléotidique sont observés au niveau de 5 régions significativement partagées entre les deux plasmides (score > 500 avec le logiciel Artémis) et représentant 71,8% de la séquence nucléotidique complète pSFn1 (Figure 45). La comparaison des

ORFs montre que les ORFs 2, 3, 6, 7, 8, 9 et 10 sont partagés tandis que l'ORF 1 est spécifique de pSFn1 et que les ORFs 12 et 13 sont spécifiques de pAK1. Enfin, si les ORFs 4 et 5 de pSFn1 ne présentent pas une homologie significative avec l'ORF 11 de pAK1, ces ORFs codent potentiellement des protéines de fonction similaire, à savoir une protéine de la queue du bactériophage de *Thiomicrospira crunogena*.

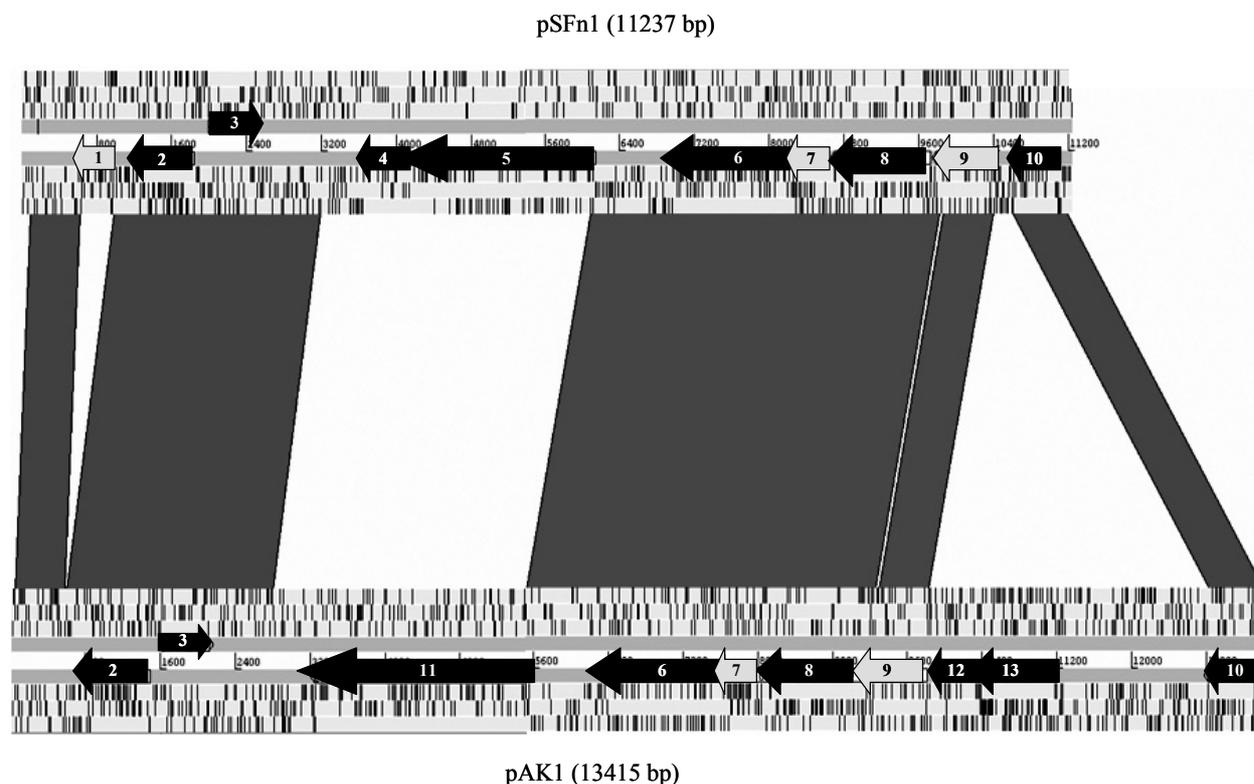


Figure 45: Comparaison linéaire des plasmides pSFn1 et pAK1. L'orientation des ORFs putatifs est indiquée par l'orientation des flèches ; en noir, les ORFs présentant une homologie significative en Blast X avec des séquences référencées dans GenBank ; en gris les ORFs putatifs ne présentant pas d'homologie significative avec des séquences connues. Les régions présentant des identités nucléotidiques significatives entre les deux plasmides sont indiquées en gris (score>500 avec le logiciel Artémis)

#### II.4 Les transconjugants *V. nigripulchritudo*/pSFn1-pUC18-pSW25T

Les sept souches de *V. nigripulchritudo* ont été mutées avec succès avec incorporation de la construction pSFn1-pUC18-pSW25T.

Les courbes de croissances effectuées pour l'ensemble des transconjugants présentent le même type de profil : la figure 46 présente les courbes de croissance type de SFn118 sauvage et transconjuguée, en présence ou non d'ampicilline. Les transconjugants sans amplicilline se caractérisent par une DO plus faible que la DO de la souche sauvage, au moment de la fin de la phase exponentielle. Cependant, au bout de 50 h de croissance les phases stationnaires de ces souches

présentent des DO proches. Le transconjugant avec ampicilline présente une DO plus faible tout au long de sa croissance (environ 0,5 de différence dans les DO) que le transconjugant sans ampicilline.

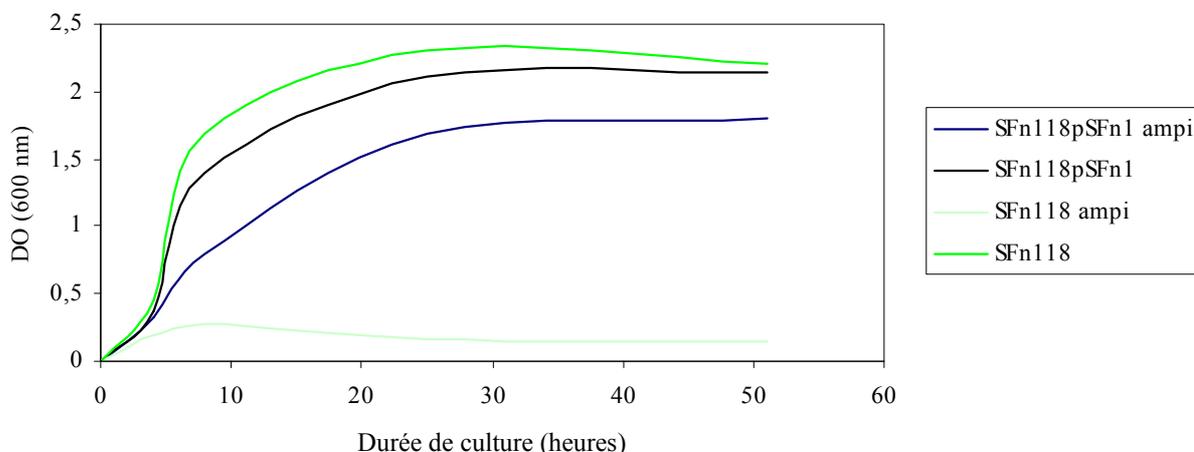


Figure 46: Courbes de croissance du transconjugant SFn118pSFn1 et de la souche sauvage SFn118 en présence ou non d'ampicilline

Pour chaque transconjugant, l'ensemble des 12 clones re-isolés à partir de cultures de 48 h sans pression de sélection à l'ampicilline, contient toujours la construction plasmidique pSFn1-pUC18-pSW25T.

## II.5 Infections expérimentales par injection intra-musculaire de *L. stylirostris* par les transconjugants

Au vu des résultats, deux périodes d'analyses ont été définies arbitrairement pour les suivis de mortalités des crevettes infectées : une première période concerne les cinquantes premières heures d'infection, la deuxième période court jusqu'à la fin de l'infection, soit à 72 heures post-infection (Figures 47 et 48). Dans la première période les crevettes infectées par les témoins HP (SFn1) et NP (SFn118) ainsi que par la souche sauvage MP correspondante, présentent les courbes de survie attendues, à savoir un taux de survie inférieur à 20% pour SFn1, supérieur à 80% pour SFn118 et entre 20 et 80% pour la souche sauvage MP ; alors que dans la seconde période, on observe 100% de mortalité pour l'ensemble des lots de crevettes infectées avec les souches étudiées, transconjugants ou témoins ; les résultats de cette seconde fenêtre d'analyse, mettent en avant un problème de fragilité des crevettes avant l'infection ou de stress anormal, rendant l'analyse des survies qui suit à prendre avec circonspection.

Dans la première période d'analyse, 3 types de survies à l'infection ont été observés avec les transconjugants :

- Les survies obtenues sont plus élevées après injection du transconjugant que de la souche sauvage, même à des doses plus élevées (Figure 47) : les mêmes profils de survie ont été obtenus pour les souches transconjuguées Wn13pSFn1, BLFn1pSFn1, BLFn2pSFn1 et AQn1pSFn1, toutes MP.

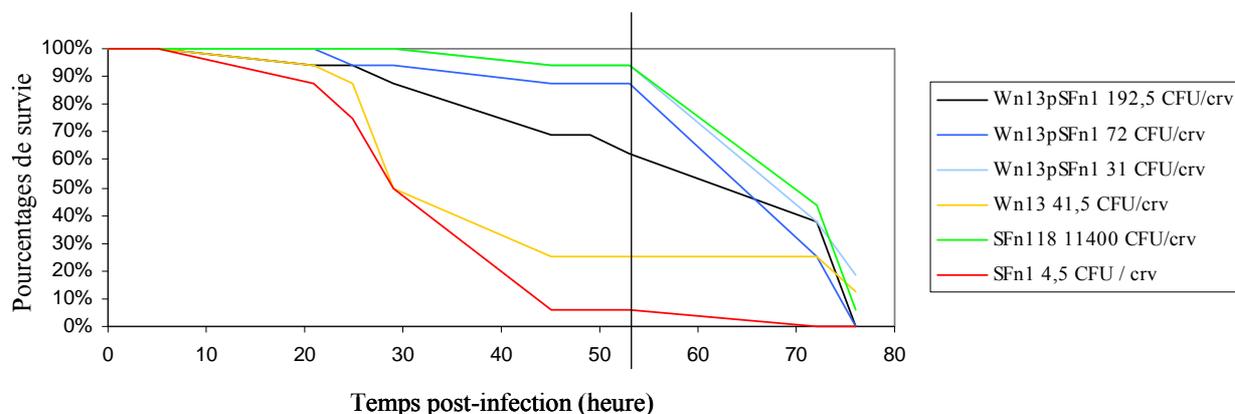


Figure 47: Courbes de survie de *L. stylirostris* jusqu'à 72 heures post-infection, après injection intra-musculaire du transconjugant Wn13pSFn1 à différentes doses, de la souche sauvage Wn13 comme témoin non muté, de SFn118 comme témoin NP et de SFn1 comme témoin HP

- Les survies sont identiques entre souche transconjuguée et sauvage : ce profil concerne uniquement la souche POn13pSFn1 (souche NP)

- Les survies obtenues sont plus faibles avec le transconjugant qu'avec la souche sauvage (Figure 48) : les mêmes profils de survies ont été obtenus pour les souches transconjuguées SFn118pSFn1 (souche NP) et ENn2pSFn1 (souche MP).

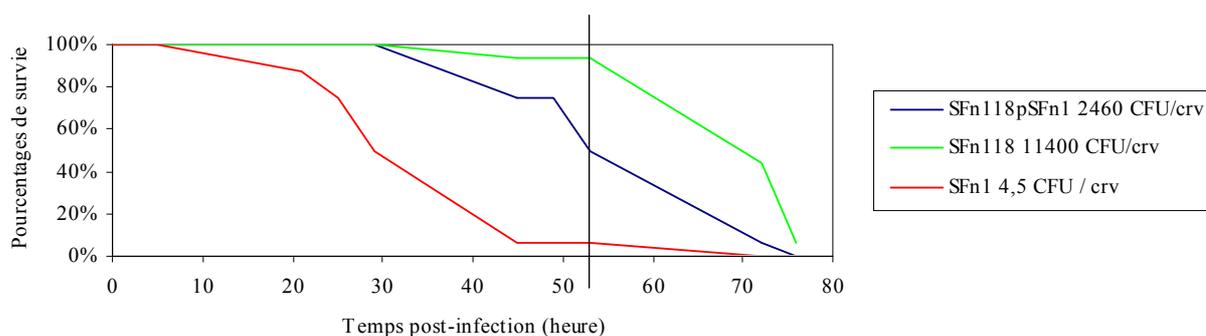


Figure 48: Courbes de survie de *L. stylirostris* jusqu'à 72 heures post-infection, après injection intra-musculaire du transconjugants SFn118pSFn1 à différentes doses, de la souche sauvage SFn118 comme témoin NP et de SFn1 comme témoin HP

Enfin les essais d'injection d'ECP n'ont pas apportés de résultats reproductibles (résultats non présentés).

### III Discussion

Le fait que parmi les 13 marqueurs génétiques spécifiques des souches HP du groupe phylogénétique A, 3 présentent des motifs phagiques et 3 autres aient été retrouvés sur le plasmide de 13,5 kpb de *V. shilonii* AK1, suggèrerait fortement l'intervention d'un ou plusieurs réplicons spécifiques des souches HP type Syndrome d'été.

C'est la raison pour laquelle des essais d'extraction plasmidique ont été entrepris. Après de multiples tentatives, un plasmide a finalement été extrait avec succès de la souche HP SFn1, puis entièrement séquencé. Les essais de purification plasmidique sur la collection de souches typées par MLST ont permis de mettre évidence des plasmides au sein des 4 autres souches HP type Syndrome d'été analysées. Ces plasmides se sont avérés très proches ou identiques à pSFn1, suite à l'analyse dans un premier temps des profils de restriction générés par *EcoRI* et *XhoI*, avec la mise en évidence de trois fragments issus de la digestion *EcoRI* de taille identique (1,1, 3,4 et 6,6 kpb) et d'un site unique *XhoI* (Figure 43). Dans un deuxième temps, les profils d'hybridations réalisés par Southern Blot entre ces plasmides préalablement digérés par les mêmes enzymes de restriction et une sonde Z2Z3 (fragment SSH16 présentant une E-Value de  $9E^{-175}$  en blast N avec le plasmide de 13,5 kpb de *V. shilonii* AK1) marquée, se sont également révélés identiques entre souches HP de type Syndrome d'été, confortant les résultats obtenus en macro-array pour le fragment SSH16. Enfin, sur les 13 fragments d'ADN de la banque soustractive identifiés en macro-array et spécifiques des souches HP du groupe A, 10 ont été localisés sur le plasmide pSFn1 (Figure 42).

La présence systématique de ce plasmide dans les souches HP type Syndrome d'été et exclusivement dans celles-ci, fait de cet élément génétique mobile un candidat marqueur de la virulence, permettant la distinction entre les deux pathotypes du groupe phylogénétique A.

On a vu dans le deuxième chapitre que des outils diagnostiques devraient être développés sur la base des 13 fragments spécifiques des souches HP du groupe A identifiés en macro-array. Maintenant que le plasmide pSFn1 est entièrement séquencé, une PCR diagnostique du Syndrome d'été ciblant spécifiquement le plasmide devrait être rapidement développée : dans cette optique, il conviendrait de valider la présence systématique de ce plasmide sur un plus grand nombre de souches HP type Syndrome d'été.

Si le plasmide pSFn1 peut être considéré comme un marqueur génétique des souches HP type Syndrome d'été, se pose alors la question du **rôle de pSFn1 pour la bactérie**. Plusieurs hypothèses peuvent être faites à ce niveau :

1) Le plasmide pSFn1 pourrait être simplement un élément génétique mobile acquis par les souches HP, mais ne jouant aucun rôle dans la virulence. Dans ce cas les facteurs de virulence supplémentaires permettant la distinction entre les souches HP et les souches MP du groupe A, se situeraient seulement

au niveau chromosomique (3 fragments SSH différentiels à support probablement chromosomique obtenus par SSH). On peut tout de même penser que des facteurs de virulence différentiels puissent avoir été apportés *via* des éléments génétiques mobiles s'intégrant au génome. Le plasmide pourrait alors être maintenu dans le cytosol lors de la division cellulaire, par un système d'addiction ou parce qu'il confère un avantage sélectif dans l'écosystème. Cette hypothèse apparaît tout de même moins probable que la seconde.

2) Le plasmide pourrait être un élément nécessaire de la virulence, permettant (en partie) l'accroissement du pouvoir pathogène des souches MP du groupe phylogénétique A en souche HP. On ne peut exclure que d'autres facteurs de virulence à localisation chromosomique participent à l'augmentation de la virulence. Si pSFn1 est effectivement un plasmide de virulence, différents modes d'action peuvent être avancés comme on l'a vu en introduction :

- Le plasmide pourrait apporter un ou plusieurs facteurs de virulence. Des éléments génétiques mobiles ont déjà été décrits dans la littérature comme vecteurs de facteurs de virulence : par exemple la toxine cholérique CT codée par le phage filamenteux CTX $\Phi$ , intégré au chromosome I de *V. cholerae* (Faruque *et al.*, 2004), ou encore le pilus TCP de *V. cholerae*, acquis par un HGT au niveau de l'îlot VPI (Tacket *et al.*, 1998).

- Le plasmide pourrait apporter des gènes intervenant dans la régulation d'autres effecteurs de la virulence dont les gènes seraient localisés au niveau chromosomique. Par exemple chez *V. cholerae* O1 El Tor et O139, le phage satellite RS1 situé en tandem avec le phage CTX $\Phi$  au niveau du chromosome I, code l'antirépresseur RstC qui permet la transcription du génome du phage CTX $\Phi$  et de sa propre région RS1, en modulant l'activité du répresseur RstR. L'antirépresseur RstC permet ainsi la transmission des phages CTX $\Phi$  et RS1 et l'expression de la toxine cholérique CT (Davis *et al.*, 2002). De même chez *V. harveyi*, l'infection de souches naïves non virulentes par le myovirus VHML confère un phénotype virulent à ces souches, probablement en rapport avec une production accrue d'hémolysines (Munro *et al.*, 2003).

- Le plasmide pourrait apporter des gènes conférant un avantage sélectif dans la crevette. Par exemple chez *V. anguillarum* 775, le sidérophore anguibactine, conférant un avantage sélectif lorsque le fer est limitant dans le milieu, est codé par deux gènes *angR* et *angT* localisés sur le plasmide pJM1 (65 kpb) ; ce plasmide porte par ailleurs l'opéron ITB (pour Iron Transport Biosynthesis) codant un complexe de protéines de transport (complexe FatABCD) permettant l'internalisation de l'anguibactine dans le cytoplasme (Actis *et al.*, 1995 ; Storck *et al.*, 2002 ; Lopez et Crosa, 2007) ; la corrélation entre la présence du plasmide pJM1 dans une souche de *V. anguillarum* et sa virulence a été démontrée (pour revue, Crosa, 1997).

Enfin, s'il s'avérait que le plasmide pSFn1 jouait un rôle prépondérant dans la virulence des souches HP de *V. nigripulchritudo* type Syndrome d'été, on pourrait alors se demander quel évènement particulier a mené à l'émergence du Syndrome d'été. Les maladies émergentes se définissent comme des infections nouvelles, causées par l'évolution ou la modification d'un agent pathogène ou d'un parasite existant. Elles se traduiront par exemple par un changement de pathogénicité, d'hôte, ou de niche écologique. Ainsi, on pourrait imaginer deux scénarios menant à l'émergence du Syndrome d'été :

- Un premier scénario repose sur un changement de pathogénicité : *V. nigripulchritudo* (de type MP du groupe A ?) déjà présent chez la crevette, par exemple commensale, ou tout du moins sans être hautement pathogène, a acquis par un mécanisme de HGT le plasmide pSFn1 qui augmente la pathogénicité de ces souches, menant par la suite à la pleine expression de la maladie.

- Un second scénario repose sur un passage accidentel d'une niche écologique à une autre. Dans ce scénario, le plasmide pSFn1 a permis la sélection d'une souche dans une niche particulière avec qui elle entretiendrait des relations de type mutualiste. Par la suite, ces souches ont été en contact accidentellement avec la crevette ; dans cette nouvelle niche écologique, le rapport hôte/microbionte a été modifié en un système hôte/pathogène. Le séquençage complet de la souche *V. fischeri* ES114 (Ruby *et al.*, 2005), symbionte du calamar, a permis de mettre en évidence un certain nombre d'homologues de gènes de virulence de *V. cholerae* (par exemple des gènes des opéron CTX et TCP et de la toxine RTX), qui dans l'espèce *V. fischeri* pourraient participer à la relation symbiotique et non à la virulence. Un même gène pourrait donc avoir selon la bactérie et selon la niche écologique de la bactérie, un impact totalement différent.

Afin de répondre aux problématiques sur l'origine des évènements supposés de HGT, des études prospectives devraient être menées au niveau des fermes de crevettes calédoniennes et dans le proche environnement (plus particulièrement au niveau des récifs coralliens), afin de rechercher le plasmide pSFn1 ou cette famille de plasmide chez *V. nigripulchritudo* et chez d'autres espèces.

L'annotation de la séquence nucléotidique de pSFn1 a permis de mettre en évidence 10 ORFs putatifs (Figure 42, Tableau 9). Aucun de ces ORFs ne peut être relié directement à la virulence. L'ORF 10 code potentiellement un activateur de la protéine osmoprotectante homologue à ProP : la protéine ProP détecte les changements de pression osmotique extracellulaire et en réponse déclenche le transport intracellulaire d'osmoprotectants, prévenant de ce fait toute déshydratation (Wood, 2006). La composition ionique de l'hémolymphe des crevettes est différente de celle de l'eau de mer et varie aussi sous l'effet de stress, comme c'est le cas par exemple au moment du déclenchement de la septicémie (Mugnier *et al.*, 2004) : ainsi cet ORF 10 homologue de ProP pourrait jouer un rôle de senseur de l'osmolarité du milieu et conduire à l'expression de gènes participant à l'adaptation du *Vibrio* à sa survie dans l'hôte ou au déclenchement de la maladie. Parmi les ORFs restants, 3 codent des gènes référencés comme COG inconnus (ORFs 1, 7 et 9) et 2 codent des protéines hypothétiques

conservées (ORFs 3 et 8) : ces éléments inconnus et hypothétiques, pourraient également jouer un rôle dans la virulence.

Les 2 ORFs 4 et 5, codant potentiellement des éléments phagiques, ont été identifiés sur pSFn1 ; les trois fragments d'ADN SSH191, SSH302 et SSH522 (Tableau 5, chapitre II) localisés au niveau des mêmes ORFs 4 et 5 de pSFn1 ont été identifiés chez trois souches MP du groupe phylogénétique A ne possédant pas le plasmide. Ceci suggère que des transferts de ces gènes aient pu avoir lieu entre chromosomes et plasmide.

Enfin, la présence de l'origine de répllication *oriV* et d'une ATPase impliquée dans la partition du plasmide, autrement dit le gène *parA*, montre que pSFn1 doit disposer de la machinerie nécessaire à sa répllication. Le gène *parB* également indispensable à la partition, n'a pas été mis en évidence ; cependant, Schumacher (2007) a montré que les gènes *parB* présentaient une forte variabilité génétique. On peut donc supposer que ce gène se trouve dans l'environnement de *parA* sur pSFn1, sans pour autant avoir été clairement identifié.

La démonstration formelle du rôle de ce plasmide dans la virulence doit nécessairement passer par des stratégies de génétique inverse. Des transconjugants contenant le plasmide ont donc été constitués, avec intégration de la construction pSFn1-pUC18-pSW25T dans 5 souches de *V. nigripulchritudo* MP et 2 souches NP.

Le fait que les essais d'infections aient mené à 100% de mortalités à 72 h post infection pour l'ensemble des souches testées, même pour les témoins négatifs, met bien en évidence une sensibilité particulière des crevettes infectées, ou un stress anormal. Ces données nous portent à interpréter les résultats avec circonspection. Des mortalités de type Syndrome d'été sont en effet relevées depuis peu au centre IFREMER de Nouvelle-Calédonie, ainsi que des mortalités type Syndrome 93 effectives au moment où les transconjugants ont été testés. La sensibilité particulière de crevettes peu standardisées et élevées en zone d'enzootie pourrait remettre en cause la validité de l'outil de pathologie expérimentale *in vivo* ; dans ce cas il y aurait un avantage certain à développer un modèle cellulaire fiable, même hétérologue.

Quoiqu'il en soit, les essais d'infections de *L. stylirostris* par les différents transconjugants n'ont pas permis d'aboutir au phénotype HP escompté. Cette absence d'effet sur la pathogénicité des souches transconjuguées peut soit s'expliquer par le fait que le plasmide n'apporte rien à la virulence, soit qu'il existe un problème technique au niveau des transconjugants ou au niveau du modèle d'infection expérimentale.

Seules les souches SFn118pSFn1 et ENn2pSFn1 ont présenté un pouvoir pathogène légèrement accru par rapport aux souches sauvages. Pour les souches Wn13pSFn1, BLFn1pSFn1, BLFn2pSFn1 et AQn1pSFn1, les survies à l'infection sont plus importantes que pour les souches sauvages correspondantes. Ceci pourrait suggérer que la construction plasmidique intégrée (pSFn1-pUC18-

pSW25T) représente pour la cellule un effet délétère ; différentes hypothèses peuvent être avancées à ce niveau :

- Les deux cassettes de résistances aux antibiotiques ampicilline et spectinomycine pourraient s'accompagner d'effets négatifs pour les souches transconjuguées.
- Le fait que la construction plasmidique contienne trois origines de réplication, pourrait également entraîner des effets négatifs.
- La ligation de pSFn1 au niveau de pUC18 n'a été effectuée qu'en un *locus* unique. Il est possible qu'un élément génétique fondamental pour le plasmide ait été ainsi interrompu.

Les courbes de croissance ont permis de mettre en évidence que les transconjugants présentent une DO légèrement plus faible en phase exponentielle et en phase stationnaire que les souches sauvages correspondantes ; ceci pourrait corroborer le fait que la construction plasmidique s'accompagne d'un léger effet délétère pour la cellule transconjuguée.

Pour remédier à ces problèmes techniques, de nouveaux essais de génétique sont en cours à l'Institut Pasteur. Différentes stratégies sont développées :

- Répéter la même stratégie mais en différents *loci* de pSFn1 et en simplifiant la construction plasmidique à intégrer.
- Se débarrasser du pSFn1 directement de la souche SFn1, par des techniques chimiques (acrydine orange) ou génétique (Le Roux *et al.*, 2007).
- A l'instar de la stratégie de génétique inverse proposée dans les perspectives du chapitre II, chaque ORF putatif de pSFn1 pourra également être délété et l'atténuation de la virulence testée ensuite expérimentalement.

Enfin, le fait que la construction plasmidique pSFn1-pUC18-pSW25T se maintienne dans les transconjugants après 48 h sans pression de sélection antibiotique, pourrait suggérer l'existence d'un système d'addiction au niveau du plasmide, permettant son maintien au moment de la division cellulaire ; mais l'analyse de la séquence n'a pas permis pour le moment d'identifier un tel système dans pSFn1.

Par ailleurs, si pSFn1 s'avérait bien être un élément-clé de la pathogénicité des souches HP type Syndrome d'été, on comprend bien que le plasmide se maintienne alors dans ces souches, puisqu'il apporterait un avantage sélectif certain dans la nouvelle niche écologique constituée par l'organisme hôte.

Outre l'incertitude sur le rôle joué par pSFn1 pour les souches de *V. nigrispulchritudo* HP type Syndrome d'été, la question se pose de **l'origine de ce plasmide**.

Parmi les 13 fragments SSH spécifiques des souches HP du groupe phylogénétique A, 3 fragments (SSH16, SSH68 et SSH155) présentaient une E-value exceptionnellement élevée en blast N,

avec les fragments Z2Z3 et Z8 séquencés du plasmide de 13,5 kpb de *V. shilonii* AK1 (Rosenberg *et al.*, non publié). Il a donc été décidé de séquencer entièrement ce plasmide de façon à pouvoir comparer sa séquence avec celle de pSFn1. L'analyse de synténie a mis en évidence une très forte homologie entre ces deux plasmides réellement surprenante quand on considère l'éloignement géographique de *V. nigripulchritudo* SFn1 et *V. shilonii* AK1 : 71,8% de pSFn1 est significativement partagé avec pAK1, avec 93% d'identité nucléotidique au niveau de 5 régions significativement partagées (Figure 45). La comparaison des ORFs montre que les ORF 2, 3, 6, 7, 8, 9 et 10 sont partagés et que si les ORFs 4 et 5 de pSFn1 ne présentent pas une homologie significative avec l'ORF 11 de pAK1, ils codent potentiellement des protéines proches au niveau de la fonction qui leur est associée. Par ailleurs, l'organisation des ORFs sur la séquence reste conservée d'un plasmide à l'autre.

Ces résultats suggèrent la possibilité du transfert horizontal de cette famille de plasmide, ou d'une partie de ce plasmide, entre espèces de bactérie. L'espèce donneuse pourrait donc être une bactérie partageant le même environnement immédiat que les souches HP de *V. nigripulchritudo*, c'est-à-dire le bassin aquacole de production ou alors un environnement proche, comme les zones de mangrove, lagunaires ou récifales. A ce niveau il est intéressant de noter que la souche *V. shilonii* AK1 (à partir de laquelle a été extrait ce plasmide pAK1) est responsable du blanchiment du corail *O. patagonica* en Méditerranée. Cette espèce pourrait partager avec *V. nigripulchritudo*, le même type de niche écologique. On peut donc imaginer que pSFn1 ait été acquis depuis une espèce bactérienne établie au niveau de coraux, comme *V. shilonii*, ou inversement. On notera pour étayer ces hypothèses, que *V. nigripulchritudo* a déjà été isolé en même temps que *V. shilonii* de coraux en Floride (Ritchie, 2006). L'équipe de Rosenberg travaillant sur le blanchiment du corail *O. patagonica* en Méditerranée n'a fait aucune étude de typage de souches de *V. shilonii*, concentrant les recherches sur la seule souche AK1 et sur les mécanismes fins de la virulence, comme l'étude d'une toxine particulière ; l'absence de résultats sur l'existence éventuelle de différents pathotypes chez *V. shilonii*, ou de corrélation entre les plasmides identifiés et la virulence, ne permet pas de discuter du rôle des plasmides (et du plasmide type pAK1 en particulier) dans la virulence de cette espèce de *Vibrio*. Si la question de la distinction entre les souches étudiées de *V. mediterranei* et de *V. shilonii* n'est toujours pas clairement résolue (Kushmaro *et al.*, 2001 ; Thompson *et al.*, 2001 ; Rosenberg et Koren, 2006), l'espèce *V. mediterranei* se différencie principalement par le fait qu'elle ne contient aucun plasmide et qu'aucune souche n'a jamais été incriminée dans des épisodes de blanchiment de coraux. On peut donc se demander si les plasmides identifiés chez *V. shilonii* AK1 et notamment pAK1, prennent ou non une part dans la virulence de cette souche vis-à-vis du corail ?

Ces questions rejoignent celles avancées sur l'origine de pSFn1 (différentes espèces, différentes niches écologiques) et sur les conséquences de son transfert intraspécifique ou interspécifique pour l'hôte (pathogénicité notamment).

## **Conclusion**

La mise en évidence de ce plasmide pSFn1 associé à la virulence chez les souches de *V. nigripulchritudo* ouvre de nombreuses perspectives : tout d'abord la nécessité de statuer sur le rôle du plasmide dans la virulence de ces souches par une approche de génétique initiée au cours de cette thèse ; ensuite, une approche prospective visant à rechercher ce plasmide ou cette famille de plasmides à partir d'isolats des fermes, ou du proche environnement lagunaire, corallien ou des mangroves chez différentes espèces bactériennes; enfin la possibilité d'utiliser ce plasmide pour le développement d'outils diagnostiques ciblant spécifiquement les souches HP de type Syndrome d'été.

L'ensemble des résultats des chapitres II et III, a fait l'objet de deux articles présentés dans les annexes 3 et 4. L'un a été accepté dans Applied and Environmental Microbiology, l'autre publié dans le journal de l'INRA : Productions Animales.

---

## **Conclusion générale et perspectives**

---

## Conclusion générale et perspectives

**Les objectifs** principaux de ces travaux de recherche étaient d'étudier la variabilité génétique d'une collection d'isolats de *V. nigripulchritudo* par des approches de typage moléculaire et d'identifier des marqueurs génétiques de la virulence de souches hautement pathogènes pour les crevettes *L. stylirostris* élevées en Nouvelle-Calédonie.

**Les analyses de phylogénie** par MLST et AP-PCR ont permis de mettre en évidence le regroupement en un unique groupe phylogénétique A, de souches moyennement pathogènes MP et hautement pathogènes HP, dont l'ensemble des souches HP isolées pendant le Syndrome d'été. La corrélation entre structuration phylogénétique et virulence suggère qu'une partie des gènes supports de la virulence est localisée au niveau chromosomique. Par ailleurs cette structuration en un seul groupe phylogénétique a étayé l'hypothèse que le Syndrome d'été est causé par un pathogène que l'on pourrait qualifier d'émergent. Ces éléments laissent supposer qu'un (des) événement(s) génétique(s) récent(s) a favorisé l'apparition des souches les plus virulentes, suivie de leur dispersion.

**La recherche de marqueurs génétiques de la virulence** par une approche soustractive entre la souche HP SFn1 type Syndrome d'été et une souche NP, ainsi que le criblage de la banque soustractive en macro-array sur une collection de souches documentées, a permis l'identification de 78 marqueurs génétiques corrélés avec différents pathotypes de *V. nigripulchritudo*, dont 13 spécifiques des souches HP de type Syndrome d'été. D'un point de vue diagnostique, ces marqueurs génétiques pourront permettre le développement d'outils (patho-arrays, PCR diagnostique) permettant notamment la distinction des deux pathotypes du groupe phylogénétique A, jusqu'à présent indiscernables par les approches de typage moléculaire testées. Ces outils devraient donc être appliqués à des études d'intérêt épidémiologique, revêtant un intérêt fondamental pour la recherche sur les mortalités associées au Syndrome d'été en Nouvelle-Calédonie.

Parmi les 13 fragments permettant de discriminer les souches HP des souches MP au sein du groupe A, 10 sont portés par **un plasmide, pSFn1**. La corrélation entre présence de pSFn1 et le statut de forte virulence a mené à l'hypothèse que le plasmide pourrait porter au moins un déterminant génétique important de la pathogénicité. Il est donc tentant de supposer qu'un transfert interspécifique du plasmide pSFn1 est à l'origine de l'émergence d'une souche pathogène HP et puisse un jour avoir des conséquences sur l'évolution d'autres souches pour le moment commensales ou faiblement pathogènes. Une série de questions se pose alors:

- D'où provient ce plasmide (de quelle espèce bactérienne *V. nigripulchritudo* l'a-t-il acquis et dans quelle niche écologique) ?

- Où peut-il aller (quelles autres espèces ou souches sont susceptibles de l'héberger : transmission intraspécifique, interspécifique) ?
- Quelles seraient pour ces bactéries les conséquences dans leur relation avec l'hôte et plus généralement avec les invertébrés marins (cul de sac, vectorisation, symbiose, pathogénicité) ?

Ces questions pourront être abordées par deux approches complémentaires : d'une part une étude d'écologie microbienne associant l'isolement de la flore microbienne à partir de niches représentatives de l'écosystème (faune des bassins de crevettes, mangrove, massifs coralliens proches des fermes), la recherche du plasmide pSFn1 ou de plasmides apparentés, l'identification et la caractérisation des souches porteuses ; d'autre part des expériences de génétique au laboratoire : transfert du plasmide chez diverses souches et espèces de bactéries et évaluation des conséquences sur la virulence des souches transformées.

Les premiers essais de génétique, présentés dans le dernier chapitre de ce manuscrit, n'ont pas permis de statuer sur l'implication du plasmide pSFn1 dans la virulence des souches HP type Syndrome d'été. Cependant les résultats encourageants des travaux présentés dans cette thèse ont abouti à un nouveau programme de recherche, dans le cadre d'une thèse développée en collaboration entre l'Institut Pasteur de Paris (Unité postulante Plasticité du Génome Bactérien, CNRS URA2171) et l'IFREMER. Ces travaux poursuivront les essais de génétique inverse sur le plasmide pSFn1 et évalueront les conséquences sur la virulence.

Par ailleurs, le Génoscope a accepté de prendre en charge **le séquençage complet du génome de la souche *V. nigripulchritudo* SFn1**, ainsi que de deux autres souches de *Vibrio* des espèces *V. aestuarianus* et *V. tapetis* (pathogènes de l'huître creuse et de la palourde, respectivement) en collaboration entre l'Institut Pasteur de Paris, l'IFREMER de La Tremblade, de Nouvelle-Calédonie et de Brest, le CNRS d'Orsay et l'UBO de Brest. Un précédent programme avait abouti au séquençage complet d'une souche de *V. splendidus* (pathogène de l'huître creuse) (Le Roux *et al.*, 2007) ; deux autres souches de cette dernière espèce ayant par ailleurs été entièrement séquencées à l'Institut Craig Venter.

**L'intérêt scientifique de ce nouveau projet** est fondamental, puisqu'il devrait permettre d'identifier des éléments génétiques nouveaux impliqués dans la pathogénicité pour les animaux marins et de comprendre leur mode d'action. Outre les applications diagnostiques, l'analyse comparative des génomes des différentes espèces permettra d'aborder et de mieux comprendre les caractéristiques évolutives des génomes des *Vibrio* et de définir les limites de leur plasticité. L'étude des gènes de virulence (séquence, régulation, localisation) ouvre en soi un champ d'investigation très large des mécanismes d'évolution : la caractérisation de transferts latéraux de ces gènes par des plasmides, phages, îlots de pathogénicité, superintégrons, ou autres éléments génétiques, permettra de mieux comprendre les mécanismes génétiques conduisant à l'émergence de bactéries pathogènes.

Une fois identifiés *in silico*, les gènes candidats à un rôle potentiel dans la pathogénicité seront inactivés et les mutants seront analysés dans les modèles de pathologie expérimentale. Si plusieurs facteurs de virulence “accessoires” devaient être mis en évidence, agissant en cascade ou en synergie pour altérer l’hôte, la stratégie de mutagenèse à développer devra permettre l’inactivation séquentielle de plusieurs de ces gènes. Un tel système de génétique inverse a été développé par Le Roux *et al.* (2007) : ce système repose sur une stratégie de mutagenèse par changement allélique, suite à deux recombinaisons consécutives.

Enfin, des systèmes d’études *ex vivo*, reposant sur la culture de cellules, pourront également être développés afin de détailler certains mécanismes de virulence. En l’absence à ce jour de lignée cellulaire issue d’invertébré marin, diverses lignées hétérologues seront évaluées afin d’envisager leur utilisation dans le cadre de l’étude des mécanismes cellulaires de la pathogénicité de ces *Vibrio*.

L’espèce *V. nigripulchritudo*, jusqu’à présent isolée de mortalités seulement dans les élevages de crevettes calédoniennes, semblerait émerger dans d’autres pays et chez d’autres espèces de crevettes. En effet, depuis un an, des mortalités anormales ont été rapportées d’élevages de crevettes *Penaeus monodon* à Madagascar ; des isolements bactériens effectués à partir de l’hémolymphe de crevettes moribondes ont mis en évidence la présence de souches de *V. nigripulchritudo* (Eliane Chungue, Institut Pasteur, communication personnelle) ; quelques souches ont été typées à l’Institut Pasteur de Paris en *gyrB* et comparées avec les isolats de Nouvelle-Calédonie : les isolats de Madagascar apparaissent clairement distincts des isolats du groupe phylogénétique A mis en évidence dans cette thèse ; par ailleurs des plasmides ont pu être extraits de ces isolats malgaches, mais leurs profils RFLP *EcoRI* apparaissent clairement différents de ceux obtenus pour pSFn1 (Le Roux, communication personnelle). Des études ultérieures viseront à tester la virulence de ces souches en infection expérimentale et à typer une plus large collection de *V. nigripulchritudo*.

Par ailleurs, *V. nigripulchritudo* a été incriminé en 2005 dans des épisodes de mortalités anormales de crevettes *Marsupenaeus japonicus* au Japon ; le caractère hautement pathogène de ces souches a pu être confirmé en infection expérimentale (Sakai *et al.*, 2007).

Pour conclure, les résultats obtenus à l’issue de ce travail de thèse ont permis de répondre aux problématiques de phylogénie et d’identification de marqueurs génétiques de la virulence de souches pathogènes de *V. nigripulchritudo* et ont conduit à de nombreuses perspectives de recherche, dont certaines sont d’ores et déjà engagées. Ces travaux constituent un réel intérêt fondamental pour l’étude des *Vibrio* en général et de *V. nigripulchritudo* en particulier, mais revêtent également un réel intérêt appliqué pour la filière aquacole de Nouvelle-Calédonie.

---

## Références bibliographiques

---

**-A-**

- Actis, L. A.; Fish, W.; Crosa, J. H.; Kellerman, K.; Ellenberger, S. R.; Hauser, F. M. & Sanders-Loehr, J.  
Characterization of anguibactin, a novel siderophore from *Vibrio anguillarum* 775(pJM1)  
*J Bacteriol*, **1986**, *167*, 57-65
- Actis, L. A.; Tolmasky, M. E.; Crosa, L. M. & Crosa, J. H.  
Characterization and regulation of the expression of FatB, an iron transport protein encoded by the pJM1  
virulence plasmid  
*Mol Microbiol*, **1995**, *17*, 197-204
- Alday-Sanz, V.; Roque, A. & Turnbull, J. F.  
Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*  
*Dis Aquat Org*, **2002**, *48*, 91-99
- Allison, G. E. & Verma, N. K.  
Serotype-converting bacteriophages and O-antigen modification in *Shigella flexneri*  
*Trends Microbiol*, **2000**, *8*, 17-23
- Altschul, S.; Madden, T.; Schaffer, A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. & Lipman, D.  
Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs  
*Nucl Acids Res*, **1997**, *25*, 3389-3402
- Alsina, M. & Blanch, R. A.  
A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species  
*J Appl Bacteriol*, **1994**, *76*, 79-85
- Annik, H.; Shchepetova, J.; Kullisaar, T.; Songisepp, E.; Zilmer, M. & Mikelsaar, M.  
Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates  
*J Appl Microbiol*, **2003**, *94*, 403-412
- Attridge, S. R.; Fazeli, A.; Manning, P. A. & Strocher, U. H.  
Isolation and characterization of bacteriophage-resistant mutants of *Vibrio cholerae* O139  
*MicrobPathog*, **2001**, *30*, 237-246
- Austin, B. & Zhang, X.  
*Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates  
*Lett Appl Microbiol*, **2006**, *43*, 119-124

**- B -**

- Bachere, E.  
Shrimp immunity and disease control  
*aquaculture*, **2000**, *191*, 3-11
- Bachere, E.; Gueguen, Y.; Gonzalez, M.; de Lorgeril, J.; Garnier, J. & Romestand, B.  
Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea*  
*gigas*  
*Immunol Rev*, **2004**, *198*, 149-168
- Bag, P. K.; Nandi, S.; Bhadra, R. K.; Ramamurthy, T.; Bhattacharya, S. K.; Nishibuchi, M.; Hamabata, T.;  
Yamasaki, S.; Takeda, Y. & Nair, G. B.  
Clonal diversity among recently emerged strains of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 associated with pandemic  
spread  
*J Clin Microbiol*, **1999**, *37*, 2354-2357
- Barrow, P. A.  
Bacteriophages mediating somatic antigenic conversion in *Salmonella cholerae-suis*: Their isolation from  
sewage and other *Salmonella* serotypes possessing the somatic 6 antigen  
*J Gen Microbiol*, **1986**, *132*, 835-837

- Bartlett, D. H. & Azam, F.  
Chitin, Cholera, and Competence  
*Science*, **2005**, *310*, 1775-1777
- Bassler, B. L.  
How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing  
*Curr Opin Microbiol*, **1999**, *2*, 582-587
- Bates, S.; Cashmore, A. M. & Wilkins, B. M.  
IncP plasmids are unusually effective in mediating conjugation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the Tra2 mating system  
*J bacteriol*, **1998**, *180*, 6538-6544
- Baumann, P.; Baumann, L.; Bang, S. S. & Woolkalis, M. J.  
Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckea*, and *Photobacterium*: abolition of the genus *Beneckea*  
*Int J Syst Bacteriol*, **1981**, *31*, 215-218
- Beaber, J. W.; Hochhut, B. & Waldor, M. K.  
Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*  
*J Bacteriol*, **2002**, *184*, 4259-4269
- Ben-Haim, Y.; Banim, E.; Kushmaro, A.; Loya, Y. & Rosenberg, E.  
Inhibition of photosynthesis and bleaching of zooxanthellae by the coral pathogen *Vibrio shiloi*  
*Environ Microbiol*, **1999**, *1*, 223-229
- Ben-Haim, Y.; Zicherman-Keren, M. & Rosenberg, E.  
Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*  
*Appl Environ Microbiol*, **2003**, *69*, 4236-4242
- Bergey  
*Bergey's Manual Systematic Bacteriology*, **1984**, *1*, 516
- Biskri, L.; Bouvier, M.; Guérout, A.; Boissard, S. & Mazel, D.  
Comparative study of class 1 integron and *Vibrio cholerae* superintegron integrase activities  
*J Bacteriol*, **2005**, *187*, 1740-1750
- Blokesch, M. & Schoolnik, G. K.  
Serogroup conversion of *Vibrio cholerae* in aquatic reservoirs  
*PLoS Pathogens*, **2007**, *3*, e81-
- Bogdan, C.; Rollinghoff, M. & Diefenbach, A.  
Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity  
*Curr Opin Immunol*, **2000**, *12*, 64-76
- Bowser, P. R.; Rosemark, R. & Reiner, C. R.  
A preliminary report of vibriosis in cultured American lobsters, *Homarus americanus*  
*J Invertebr Pathol*, **1981**, *37*, 80-85
- Brown, J. R.  
Ancient horizontal gene transfer  
*Nat Rev Genet*, **2003**, *4*, 121-132
- Buller, N. B.  
Bacteria from fish and other Aquatic animals: a practical identification manual  
*CABI publishing*, **2004**, 67-73

- C -

- Campos, J.; Martinez, E.; Marrero, K.; Silva, Y.; Rodriguez, B. L.; Suzarte, E.; Ledon, T. & Fando, R.  
 Novel type of specialized transduction for CTXphi or its satellite phage RS1 mediated by filamentous phage  
 VGJphi in *Vibrio cholerae*  
*J Bacteriol*, **2003**, *185*, 7231-7240
- Cao, J. & Meighen, E.  
 Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *Vibrio harveyi*  
*J Biol Chem*, **1989**, *264*, 21670-21676
- Caroff, M. & Karibian, D.  
 Structure of bacterial lipopolysaccharides  
*Carbohydrate Res*, **2003**, *338*, 2431-2447
- Carsiotis, M.; Stocker, B. A.; Weinstein, D. L. & O'Brien, A. D.  
 A *Salmonella typhimurium* virulence gene linked to flg  
*Infect Immun*, **1989**, *57*, 3276-3280
- Casadevall, A. & Pirofski, L.  
 Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity  
*Infect Immun*, **1999**, *67*, 3703-3713
- Cervino, J. M.; Hayes, R. L.; Polson, S. W.; Polson, S. C.; Goreau, T. J.; Martinez, R. J. & Smith, G. W.  
 Relationship of *Vibrio* Species infection and elevated temperatures to Yellow Blotch/Band Disease in Caribbean  
 corals  
*Appl Environ Microbiol*, **2004**, *70*, 6855-6864
- Chen, X.; Schauder, S.; Potier, N.; Van Dorsselaer, A.; Pelczer, I.; Bassler, B. L. & Hughson, F. M.  
 Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron  
*Nature*, **2002**, *415*, 545-549
- Chen, C.; Wu, K.; Chang, Y.; Chang, C.; Tsai, H.; Liao, T.; Liu, Y.; Chen, H.; Shen, A. B.; Li, J.; Su, T.; Shao,  
 C.; Lee, C.; Hor, L. & Tsai, S.  
 Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen  
*Genome Res*, **2003**, *13*, 2577-2587
- Chythanya, R.; Karunasagar, I. & Karunasagar, I.  
 Inhibition of shrimp pathogenic *Vibrios* by a marine *Pseudomonas* I-2 strain  
*Aquaculture*, **2002**, *208*, 1-10
- Cieslewicz, M. J.; Chaffin, D.; Glusman, G.; Kasper, D.; Madan, A.; Rodrigues, S.; Fahey, J.; Wessels, M. R. &  
 Rubens, C. E.  
 Structural and genetic diversity of group B *Streptococcus* capsular polysaccharides  
*Infect Immun*, **2005**, *73*, 3096-3103
- Cohen, A. L. V.; Oliver, J. D.; DePaola, A.; Feil, E. J. & Fidelma Boyd, E.  
 Emergence of a virulent clade of *Vibrio vulnificus* and correlation with the presence of a 33-Kilobase genomic  
 island  
*Appl Environ Microbiol*, **2007**, *73*, 5553-5565
- Colquhoun, D. J. & Sorum, H.  
 Temperature dependent siderophore production in *Vibrio salmonicida*  
*Microb Pathog*, **2001**, *31*, 213-219
- Comstock, L. E.; Johnson, J. A.; Michalski, J. M.; Morris, J. G. & Kaper, J. B.  
 Cloning and sequence of a region encoding a surface polysaccharide of *Vibrio cholerae* O139 and  
 characterization of the insertion site in the chromosome of *Vibrio cholerae* O1  
*Mol Microbiol*, **1996**, *19*, 815-826

- Cooper, J. E. & Feil, E. J.  
Multilocus sequence typing-what is resolved?  
*Trends Microbiol*, **2004**, *12*, 373-377
- Costa, R.; Mermoud, I.; Koblavi, S.; Morlet, B.; Haffner, P.; Berthe, F.; Legroumellec, M. & Grimont, P.  
Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia  
*Aquaculture*, **1998**, *164*, 297-309
- Coster, T.; Killeen, K.; Waldor, M.; Beattie, D.; Spriggs, D.; Kenner, J.; Trofa, A.; Sadoff, J.; Mekalanos, J. & Taylor, D.  
Safety, immunogenicity, and efficacy of live attenuated *Vibrio cholerae* O139 vaccine prototype  
*The Lancet*, **1995**, *345*, 949-953
- Cotter, P. A. & DiRita, V. J.  
Bacterial virulence gene regulation; an evolutionary perspective  
*Annu Rev Microbiol*, **2000**, *54*, 519-565
- Crosa, J.; Actis, L. & Tomlasky, M.  
The biology and pathogenicity of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*  
*The biology of Vibrios ASM press*, **2006**, 251-265
- Crosa, J. H.  
Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria  
*Microbiol Mol Biol Rev*, **1997**, *61*, 319-336
- Crosa, J. H.  
A plasmid associated with virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* specifies an iron-sequestering system  
*Nature*, **1980**, *284*, 566-568
- Crosa, J. H.; Schiewe, M. H. & Falkow, S.  
Evidence for plasmid contribution to the virulence of fish pathogen *Vibrio anguillarum*  
*Infect Immun*, **1977**, *18*, 509-513
- Crosa, J. H. & Walsh, C. T.  
Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria  
*Microbiol Mol Biol Rev*, **2002**, *66*, 223-249
- Croxatto, A.; Pride, J.; Hardman, A.; Williams, P.; Camara, M. & Milton, D. L.  
A distinctive dual-channel quorum-sensing system operates in *Vibrio anguillarum*  
*Mol Microbiol*, **2004**, *52*, 1677-1689
- D -**
- Daborn, P. J.; Waterfield, N.; Silva, C. P.; Au, C. P. Y.; Sharma, S. & French-Constant, R. H.  
A single *Photobacterium* gene, makes caterpillars floppy (mcf), allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects  
*PNAS*, **2002**, *99*, 10742-10747
- Davies, J.  
Origins and evolution of antibiotic resistance  
*Microbiologia*, **1996**, *12*, 9-16
- Davis, B.; Kimsey, H.; Kane, A. & Waldor, M.  
A satellite phage-encoded antirepressor induces repressor aggregation and cholera toxin gene transfer  
*EMBO J*, **2002**, *21*, 4240-4249
- De La Peña, L. D.; Momomaya, K.; Nakai, T. & Muroga, K.  
Detection of the causative agent of vibriosis in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*  
*Fish Pathol*, **1992**, *244*, 223-228

- Demarre, G.; Guerout, A.; Matsumoto-Mashimo, C.; Rowe-Magnus, D. A.; Marliere, P. & Mazel, D.  
A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncP[alpha]) conjugative machineries and their cognate Escherichia coli host strains  
*Res Microbiol*, **2005**, *156*, 245-255
- DeShazer, D.  
Genomic diversity of Burkholderia pseudomallei clinical isolates: subtractive hybridization reveals a Burkholderia mallei-specific prophage in B. pseudomallei 1026b  
*J Bacteriol*, **2004**, *186*, 3938-3950
- Destoumieux, D.  
Caractérisation et analyse de l'expression des pénaeidines, peptides antimicrobiens isolés chez la crevette pénaéide Penaeus vannamei (Crustacea, Décapoda)  
*Thèse d'Université de Montpellier II*, **1998**
- Destoumieux, D.; Munoz, M.; Bulet, P. & Bachère, E.  
Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda)  
*Cell Mol Life Sci*, **2000**, *57*, 1260-71
- Destoumieux-Garzon, D.; Saulnier, D.; Garnier, J.; Jouffrey, C.; Bulet, P. & Bachere, E.  
Crustacean immunity: antifungal peptides are generated from the C-terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge  
*J Biol Chem*, **2001**, 47070-47077
- Diggles, B.; Moss, G.; Carson, J. & Anderson, C.  
Luminous vibriosis in rock lobster Jasus verreauxi (Decapoda: Palinuridae) phyllosoma larvae associated with infection by Vibrio harveyi  
*Dis Aquat Organ*, **2000**, *43*, 127-137
- DiRita, V.; Parsot, C.; Jander, G. & Mekalanos, J.  
Regulatory cascade controls virulence in Vibrio cholerae  
*PNAS*, **1991**, *88*, 5403-5407
- Doolittle, F. W.  
You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes  
*Trends Gen*, **1998**, *14*, 307-311
- Doolittle, W. F.  
Lateral genomics  
*Trends Cell Biol*, **1999**, *9*, 5-8
- Dubnau, D.  
DNA uptake in bacteria  
*Annu Rev Microbiol*, **1999**, *53*, 217-244
- Dunn, A. K.; Martin, M. O. & Stabb, E. V.  
Characterization of pES213, a small mobilizable plasmid from Vibrio fischeri  
*Plasmid*, **2005**, *54*, 114-134
- Dutta, C. & Pan, A.  
Horizontal gene transfer and bacterial diversity  
*J Biosc*, **2002**, *27*, 27-33
- E -
- Egan, E. S. & Waldor, M. K.  
Distinct replication requirements for the two Vibrio cholerae chromosomes  
*Cell*, **2003**, *114*, 521-530

Egidius, E.; Andersen, K.; Clausen, E. & Raa, J.  
Cold-water vibriosis or 'Hitra disease' in Norwegian salmonid farming  
*J Fish Dis*, **1981**, *4*, 353-354

Egidius, E.; Wiik, R.; Andersen, K.; Hoff, K. A. & Hjeltnes, B.  
*Vibrio salmonicida* sp. nov., a new fish pathogen  
*Inter J Syst Bacteriol*, **1986**, *36*, 518-520

Enright, M. C. & Spratt, B. G.  
Multilocus sequence typing  
*Trends Microbiol*, **1999**, *7*, 482-487

- F -

FAO/OIE/WHO Expert Consultation, R.  
Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance  
*Issued by the World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Organisation for Animal Health*,  
Seoul, Republic of Korea, 13-16 June **2006**

Farrell, D. & Crosa, J.  
Purification and characterization of a secreted protease from the pathogenic marine bacterium *Vibrio anguillarum*  
*Biochemistry*, **1991**, *30*, 3432-3436

Faruque, S. M.; Asadulghani, Kamruzzaman, M.; Nandi, R. K.; Ghosh, A. N.; Nair, G. B.; Mekalanos, J. J. & Sack, D. A.  
RS1 element of *Vibrio cholerae* can propagate horizontally as a filamentous phage exploiting the morphogenesis genes of CTXPhi  
*Infect Immun*, **2002**, *70*, 163-170

Faruque, S. M. & Mekalanos, J. J.  
Pathogenicity islands and phages in *Vibrio cholerae* evolution  
*Trends Microbiol*, **2003**, *11*, 505-510

Foster, J. S.; Apicella, M. A. & McFall-Ngai, M. J.  
*Vibrio fischeri* lipopolysaccharide induces developmental apoptosis, but not complete morphogenesis, of the *Euprymna scolopes* symbiotic light organ  
*Dev Biol*, **2000**, *226*, 242-254

Foulongne, V.; Michaux-Charachon, S.; Jumas-Bilak, E.; O'Callaghan, D. & Ramuz, M.  
Stratégies pour la recherche de gènes de virulence chez les bactéries pathogènes  
*Pathol Biol*, **2004**, *52*, 104-114

Fuller, R.  
Probiotics in man and animals.  
*J Appl Bacteriol*, **1989**, *66*, 365-378

Fullner, K. J.; Boucher, J. C.; Hanes, M. A.; Haines, I.; Meehan, B. M.; Walchle, C.; Sansonetti, P. J. & Mekalanos, J. J.  
The contribution of accessory Toxins of *Vibrio cholerae* O1 El Tor to the proinflammatory response in a murine pulmonary Cholera model  
*J Exp Med*, **2002**, *195*, 1455-1462

- G -

Galtier, N.; Gouy, M. & Gautier, C.  
SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny  
*Comput Appl Biosci*, **1996**, *12*, 543-548

- Garnier, M.; Labreuche, Y.; Garcia, C.; Robert, M. & Nicolas, J.  
Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in Summer Mortalities of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*  
*Microb Ecol*, **2007**, *53*, 187-196
- Gascuel, O.  
BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data  
*Mol Biol Evol*, **1987**, *14*, 685-695
- Gay, M.; Berthe, F. C. J. & Le Roux, F.  
Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*  
*Dis Aquat Org*, **2004**, *59*, 49-56
- Gay, M.; Renault, T.; Pons, A. & Roux, F. L.  
Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations  
*Dis Aquat Org*, **2004**, *62*, 65-74
- Goarant, C.; Merien, F.; Berthe, F.; Mermoud, I. & Perolat, P.  
Arbitrarily primed PCR to type *Vibrio* spp. pathogenic for shrimp  
*Appl Environ Microbiol*, **1999**, *65*, 1145-1151
- Goarant, C.  
Epidémiologie et facteurs de virulence des bactéries du genre *Vibrio* responsables de mortalité de crevettes d'élevage en Nouvelle-Calédonie. Perspectives de lutte  
*Thèse, Université de Polynésie Française*, **2000**
- Goarant C.; Herlin J.; Ansquer D.; Domalain D.; Imbert F.; Marteau A-L.  
Bases des connaissances sur l'épidémiologie de *Vibrio nigripulchritudo*, agent étiologique du « Syndrome d'été » chez les crevettes d'élevage de Nouvelle-Calédonie.  
*Rapport IFREMER DRV/RST/RA/LAC 2002-03, Nouméa*, **2003**, 23
- Goarant, C.; Herlin, J.; Ansquer, D.; Brizard, R. & Marteau, A. L.  
*Vibrio penaeicida* and Syndrome 93 in New Caledonian prawn farming: review and perspectives  
*In Styli 2003, Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie (in French with English abstract)*. C. Goarant, C., Herbland, A., Harache, Y., and Mugnier, C. (eds). *Acte de Colloque*, **2004**, 203-209
- Gorant, C.; Ansquer, D.; HerlinN, J.; Domalain, D.; Imbert, F. & De Decker, S.  
"Summer Syndrome" in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia : pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*  
*Aquaculture*, **2006**, *253*, 105-113
- Goarant, C. & Merien, F.  
Quantification of *Vibrio penaeicida*, the etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonian shrimp, by real-time PCR using SYBR Green I chemistry  
*J Microbiol Meth*, **2006**, *67*, 27-35
- Goarant, C.; Reynaud, Y.; Ansquer, D.; Decker, S. d.; Saulnier, D. & Roux, F. l.  
Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia  
*Syst Appl Microbiol*, **2006**, *29*, 570-580
- Goarant, C.; Reynaud, Y.; Ansquer, D.; de Decker, S. & Merien, F.  
Sequence polymorphism-based identification and quantification of *Vibrio nigripulchritudo* at the species and subspecies level targeting an emerging pathogen for cultured shrimp in New Caledonia  
*J Microbiol Meth*, **2007**, *70*, 30-38
- Golden, N. J.; Camilli, A. & Acheson, D. W. K.  
Random Transposon Mutagenesis of *Campylobacter jejuni*  
*Infect and Immun*, **2000**, *68*, 5450-5453

Gomez-Gil, B.; Roque, A. & Turnbull, J. F.

The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms  
*Aquaculture*, **2000**, *191*, 259-27

Goyard, E.; Goarant, C.; Ansquer, D.; Brun, P.; Decker, S. D.; dufour, R.; Galinié, C.; Peignon, J. M.; vourey, E.; Harache, Y. & Patrois, J.

Cross breeding of different domesticated lines as a simple way for genetic improvement in small aquaculture industries: heterosis and inbreeding effects of growth and survival rates in the Pacific Blue Shrimp *Litopenaeus stylirostris*  
*in press*

Gray, L. & Kreger, A.

Mouse skin damage caused by cytolysin from *Vibrio vulnificus* and by *V. vulnificus* infection  
*J Infect dis*, **1987**, *155*, 236-241

Groisman, E.; Sturmoski, M.; Solomon, F.; Lin, R. & Ochman, H.

Molecular, functional, and evolutionary analysis of sequences specific to *Salmonella*  
*PNAS*, **1993**, *90*, 1033-1037

Gu, K.; Linhardt, R. J.; Laliberté, M.; Gu, K. & Zimmermann, J.

Purification, characterization and specificity of chondroitin lyases and glycuronidase from *Flavobacterium heparinum*  
*Biochem J*, **1995**, *312*, 569-577

Gulig, P. A.; Bourdage, K. L. & Starks, A. M.

Molecular pathogenesis of *Vibrio vulnificus*  
*J Microbiol*, **2005**, *43*, 118-13

- H -

Hall, T. A.

BioitEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT  
*Nucl Acids Symp Ser*, **1999**, *41*, 95-98

Halpern, M.; Raats, D.; Lavion, R. & Mittler, S.

Dependent population dynamics between chironomids (nonbiting midges) and *Vibrio cholerae*  
*FEMS Microbiol Ecol*, **2006**, *55*, 98-104

Handfield, M. & Levesque, R. C.

Strategies for isolation of in vivo expressed genes from bacteria  
*FEMS Microbiol Rev*, **1999**, *23*, 69-91

Harvell, C. D.; Kim, K.; Burkholder, J. M.; Colwell, R. R.; Epstein, P. R.; Grimes, D. J.; Hofmann, E. E.; nad A. D. M. E. Osterhaus, E. K. L.; Overstreet, R. M.; Porter, J. W.; Smith, G. W. & Vasta, G. R.

Emerging marine diseases: climate links and anthropogenic factors  
*Science*, **1999**, *285*, 1505-1510

Hase, C. C. & Mekalanos, J. J.

TcpP protein is a positive regulator of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*  
*PNAS*, **1998**, *95*, 730-73

Haugen, P.; Lorentzen, M.; Hjerde, E.; Riise, E.; Pedersen, H.; hansen, G.; Ahmad, R.; Altermark, B.; Leiros, I.; Helland, R.; SchroderLeiros, H.; Smalas, A. & Willassen, N.

The *Vibrio salmonicida* project

*The second conference on the biology of Vibrios, VIBRIO 2007*, **2007**, book of abstract, 93

Hayes, F.

Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest  
*Science*, **2003**, *301*, 1496-1499

- Heidelberg, J. F.; Eisen, J. A.; Nelson, W. C.; Clayton, R. A.; Gwinn, M. L.; Dodson, R. J.; Haft, D. H.; Hickey, E. K.; Peterson, J. D.; Umayam, L.; Gill, S. R.; Nelson, K. E.; Read, T. D.; Tettelin, H.; Richardson, D.; Ermolaeva, M. D.; Vamathevan, J.; Bass, S.; Qin, H.; Dragoi, I.; Sellers, P.; Mc Donald, L.; Utterback, T.; Fleishmann, R. D.; Nierman, W. C.; White, O.; Salzberg, S. L.; Smith, H. O.; Colwell, R. R.; Mekalanos, J. J.; Venter, J. C. & Fraser, C. M.  
DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*  
*Nature*, **2000**, *406*, 477-483
- Hendrix, R. W.; Smith, M. C. M.; Burns, R. N.; Ford, M. E. & Hatfull, G. F.  
Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: All the world's a phage  
*PNAS*, **1999**, *96*, 2192-2197
- Henke, J. M. & Bassler, B. L.  
Quorum sensing regulates Type III Secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*  
*J Bacteriol*, **2004**, *186*, 3794-3805
- Hensel, M.; Shea, J.; Gleeson, C.; Jones, M.; Dalton, E. & Holden, D.  
Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection  
*science*, **1995**, *269*, 400-3
- Higgins, D. E.; Nazareno, E. & DiRita, V. J.  
The virulence gene activator ToxT from *Vibrio cholerae* is a member of the AraC family of transcriptional activators  
*J Bacteriol*, **1992**, *174*, 6974-6980
- Hochhut, B.; Marrero, J. & Waldor, M. K.  
Mobilization of plasmids and chromosomal DNA mediated by the SXT element, a constin found in *Vibrio cholerae* O139  
*J Bacteriol*, **2000**, *182*, 2043-2047
- Hochhut, B.; Lotfi, Y.; Mazel, D.; Faruque, S. M.; Woodgate, R. & Waldor, M. K.  
Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins  
*Antimicrob Agents Chemother*, **2001**, *45*, 2991-3000
- Hoi, L.; Dalsgaard, I.; DePaola, A.; Siebeling, R. J. & Dalsgaard, A.  
Heterogeneity among Isolates of *Vibrio vulnificus* Recovered from Eels (*Anguilla anguilla*) in Denmark  
*Appl Environ Microbiol*, **1998**, *64*, 4676-4682
- Holmstrom, C. & Kjelleberg, S.  
Marine Pseudoalteromonas species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents  
*FEMS Microbiol Ecol*, **1999**, *30*, 285-293
- Hong, S.; Kim, B.; Shin, H.; Kim, W.; Lee, K.; Kim, Y. & Kim, D.  
Purification and characterization of novel chondroitin ABC and AC lyases from *Bacteroides stercoris* HJ-15, a human intestinal anaerobic bacterium  
*Eur J Biochem*, **2002**, *269*, 2934-2940
- Hueck, C. J.  
Type III Protein Secretion Systems in bacterial pathogens of animals and plants  
*Microbiol Mol Biol Rev*, **1998**, *62*, 379-433
- Hughes, T. P.; Baird, A. H.; Bellwood, D. R.; Card, M.; Connolly, S. R.; Folke, C.; Grosberg, R.; Hoegh-Guldberg, O.; Jackson, J. B. C.; Kleypas, J.; Lough, J. M.; Marshall, P.; Nystrom, M.; Palumbi, S. R.; Pandolfi, J. M.; Rosen, B. & Roughgarden, J.  
Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs  
*Science*, **2003**, *301*, 929-933

- I -

Ichinose, Y.; Yamamoto, K.; Nakasone, N.; Tanabe, M. J.; Takeda, T.; Miwatani, T. & Iwanaga, M.  
Enterotoxigenicity of El Tor-like hemolysin of non-O1 *Vibrio cholerae*  
*Infect Immun*, **1987**, *55*, 1090-1093

Iida, T.; Park, K. & Honda, T.  
*Vibrio parahaemolyticus*  
*The Biology of Vibrios ASM press*, **2006**, 340-348

Ishimaru, K.; Akagawa-Matsushita, M. & Muroga, K.  
*Vibrio penaeicida* sp. nov., a pathogen of kuruma prawns (*Penaeus japonicus*)  
*Int J Syst Bacteriol*, **1995**, *45*, 134-138

Islam, M.; Mahmuda, S.; Morshed, M.; Bakht, H.; Khan, M.; Sack, R. & DA, D. S.  
Role of cyanobacteria in the persistence of *Vibrio cholerae* O139 in saline microcosms  
*Can J Microbiol*, **2004**, *50*, 127-131

- J -

Jain, R.; Rivera, M. C.; Moore, J. E. & Lake, J. A.  
Horizontal gene transfer in microbial genome evolution  
*Theor Popul Biol*, **2002**, *61*, 489-495

Jiravanichpaisal, P.; Miyazaki, T. & Limsuwan., C.  
Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*  
*J Aquat Anim Health*, **1994**, *6*, 27-35

Joseph, L. A. & Wright, A. C.  
Expression of *Vibrio vulnificus* capsular polysaccharide inhibits biofilm formation  
*J Bacteriol*, **2004**, *186*, 889-893

Juíz-Río, S.; Osorio, C. R.; de Lorenzo, V. & Lemos, M. L.  
Subtractive hybridization reveals a high genetic diversity in the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: evidence of a SXT-like element  
*Microbiology*, **2005**, *151*, 2659-2669

- K -

Kachlany, S. C.; Planet, P. J.; Bhattacharjee, M. K.; Kollia, E.; DeSalle, R.; Fine, D. H. & Figurski, D. H.  
Nonspecific adherence by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* requires genes widespread in Bacteria and Archaea  
*J Bacteriol*, **2000**, *182*, 6169-6176

Kachlany, S. C.; Planet, P. J.; DeSalle, R.; Fine, D. H. & Figurski, D. H.  
Genes for tight adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: from plaque to plague to pond scum  
*Trends Microbiol*, **2001**, *9*, 429-437

Kado, C. I. & Liu, S. T.  
Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids  
*J Bacteriol*, **1981**, *145*, 1365-1373

Kaper, J.; Baldini, H. L. M. & Levine, M.  
Recombinant nontoxigenic *Vibrio cholerae* strains as attenuated cholera vaccine candidates  
*Nature*, **1984**, *308*, 655-658

Karaolis, D. K.; Johnson, J. A.; Bailey, C. C.; Boedeker, E. C.; Kaper, J. B. & Reeves, P. R.  
A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains  
*PNAS*, **1998**, *95*, 3134-3139

- Kautsky, N.; Ronnback, P.; Tedengren, M. & Troell, M.  
Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming  
*Aquaculture*, **2000**, *191*, 145-161
- Kita-Tsukamoto, K.; Oyaizu, H.; Nanba, K. & Simidu, U.  
Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family Vibrionaceae, determined on the basis of 16S rRNA sequences  
*Int J Syst Bacteriol*, **1993**, *43*, 8-19
- Kosaka, M.  
Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding  
*Microbiol Alim Nut*, **1986**, *4*, 121-135
- Kothary, M. & Kreger, A.  
Purification and characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus*  
*J Gen Microbiol*, **1987**, *133*, 1783-1791
- Kovach, M. E.; Shaffer, M. D. & Peterson, K. M.  
A putative integrase gene defines the distal end of a large cluster of ToxR-regulated colonization genes in *Vibrio cholerae*  
*Microbiology*, **1996**, *142*, 2165-2174
- Kurland, C. G.  
Something for everyone : Horizontal gene transfer in evolution  
*EMBO J*, **2000**, *1*, 92-95
- Kurland, C. G.; Canback, B. & Berg, O. G.  
Horizontal gene transfer: A critical view  
*PNAS*, **2003**, *100*, 9658-9666
- Kushmaro, A.; Banin, E.; Loya, Y.; Stackebrandt, E. & Rosenberg, E.  
*Vibrio shiloi* sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*  
*Int J Syst Evol Microbiol.*, **2001**, *51*, 1383-1388
- L -
- Labreuche, Y.  
Caractérisation de la virulence d'une souche de *Vibrio aesturianus*, pathogène de l'huître *Crassostrea gigas*  
*Thèse d'Université de Bretagne Occidentale*, **2007**
- Ladhani, S.  
Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*  
*FEMS Immun Med Microbiol*, **2003**, *39*, 181-189
- Lan, R. & Reeves, P.  
Gene transfer is a major factor in bacterial evolution  
*Mol Biol Evol*, **1996**, *13*, 47-55
- Lauriano, C. M.; Ghosh, C.; Correa, N. E. & Klose, K. E.  
The sodium-driven flagellar motor controls exopolysaccharide expression in *Vibrio cholerae*  
*J Bacteriol*, **2004**, *186*, 4864-4874
- Lawrence, J. G. & Ochman, H.  
Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome  
*PNAS*, **1998**, *95*, 9413-9417
- Le, T. X.; Munekage, Y. & Kato, S.  
Antibiotic resistance in bacteria from shrimp farming in mangrove areas  
*Sci Total Environ*, **2005**, *349*, 95-105

- Lecuit, M.; Vandormael-Pournin, S.; Lefort, J.; Huerre, M.; Gounon, P.; Dupuy, C.; Babinet, C. & Cossart, P.  
A transgenic model for Listeriosis: Role of internalin in crossing the intestinal barrier  
*Science*, **2001**, *292*, 1722-1725
- Lee, C.; Amaro, C.; Sanjuán, E. & Hor, L.  
Identification of DNA sequences specific for *Vibrio vulnificus* Biotype 2 strains by Suppression Subtractive Hybridization  
*Appl Environ Microbiol*, **2005**, *71*, 5593-5597
- Lee, K.; Chen, Y. & Liu, P.  
Hemostasis of Tiger Prawn *Penaeus monodon* affected by *Vibrio harveyi*, extracellular products, and a toxic cysteine protease  
*Blood Cell Mol Dis*, **1999**, *25*, 180-192
- Lee, K.; Liu, P. & Chen, Y.  
Electrophoretic characterization of a novel cysteine protease produced by *Vibrio harveyi*  
*Electrophoresis*, **1999**, *20*, 3343-3346
- Lee, K. K.; Yu, S. R. & Liu, P. C.  
Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*  
*Curr Microbiol*, **1997**, *34*, 110-117
- Lee, S. E.; Ryu, P. Y.; Kim, S. Y.; Kim, Y. R.; Koh, J. T.; Kim, O. J.; Chung, S. S.; Choy, H. E. & Rhee, J. H.  
Production of *Vibrio vulnificus* hemolysin in vivo and its pathogenic significance  
*Biochem Biophys Res Commun*, **2004**, *324*, 86-91
- Lee, S. H.; Hava, D. L.; Waldor, M. K. & Camilli, A.  
Regulation and temporal expression patterns of *Vibrio cholerae* virulence genes during infection  
*Cell*, **1999**, *99*, 625-634
- Lemonnier, H.  
Effet des conditions environnementales sur le développement des pathologies à Vibriodans les élevages de crevettes en Nouvelle-Calédonie  
*Thèse d'Université de La Rochelle*, **2007**
- Liu, P. & Lee, K. LeRoux, F.; Gay, M.; Lambert, C.; Waechter, M.; Poubalanne, S.; Chollet, B.; Nicolas, J. & Berthe, F.  
Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events  
*Aquat Living Resour*, **2002**, *15*, 251-258
- LeRoux, F.; Gay, M.; JL, C. L.; Nicolas; Gouy, M. & Berthe, F.  
Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences  
*Dis Aquat Org*, **2004**, *58*, 143-150
- LeRoux, F. & Austin, B.  
The Biology of Vibrios  
*ASM press*, **2006**
- LeRoux, F.; Binesse, J.; Zouine, M.; Chakroun, N.; Saulnier, D.; Bouchier, C.; Zidane, N.; Ma, L.; Rusniok, C.; Buchrieser, C. & Mazel, D.  
Complete genome sequence of *Vibrio splendidus*: a pathogenic bacterium for a wide range of marine animals  
*The second conference on the biology of Vibrios, VIBRIO 2007, Book of abstracts*, **2007**, 103
- Le Roux, F.; Binesse, J.; Saulnier, D. & Mazel, D.  
Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counterselectable suicide vector  
*Appl Environ Microbiol*, **2007**, *73*, 777-784

- Lightner, D.  
Vibrio disease of penaeid shrimp  
*In: C.J. Sindermann and D.V. Lightner, Editors, Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture, Elsevier, Amsterdam, 1998, 42-47*
- Lightner, D. V. & Redman, R. M.  
Shrimp diseases and current diagnostic methods  
*Aquaculture, 1998, 164, 201-220*
- Lin, W.; Fullner, K. J.; Clayton, R.; Sexton, J. A.; Rogers, M. B.; Calia, K. E.; Calderwood, S. B.; Fraser, C. & Mekalanos, J. J.  
Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage  
*PNAS, 1999, 96, 1071-1076*
- Ling, J.; Moore, R.; Surette, M. & Woods, D.  
The *mviN* homolog in *Burkholderia pseudomallei* is essential for viability and virulence  
*Can J Microbiol, 2006, 52, 831-84*
- Linkous, D. A. & Oliver, J. D.  
Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*  
*FEMS Microbiol Lett, 1999, 174, 207-214*
- Lipp, E. K.; Huq, A. & Colwell, R. R.  
Effects of global climate on infectious disease: the Cholera model  
*Clin Microbiol Rev, 2002, 15, 757-770*
- Litwin, C.; Rayback, T. & Skinner, J.  
Role of catechol siderophore synthesis in *Vibrio vulnificus* virulence  
*Infect Immun, 1996, 64, 2834-2838*
- Liu, C. H.; ChunHung, L.; Winton, C.; Cheng, W.; JungPing, H.; JiannChu, C. & Chen, J. C.  
*Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing  
*Dis Aquat Org, 2004, 61, 169-174*
- Liu, D.; Lawrence, M. L.; Ainsworth, A. J. & Austin, F. W.  
Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence  
*Int J Food Microbiol, 2007, 118, 101-115*
- Liu, J. & Mushegian, A.  
Displacements of prohead protease genes in the late operons of double-stranded-DNA bacteriophages  
*J Bacteriol, 2004, 186, 4369-4375*
- Liu, P. & Lee, K.  
Cysteine protease is a major exotoxin of pathogenic luminous *Vibrio harveyi* in the tiger prawn, *Penaeus monodon*  
*Lett Appl Microbiol, 1999, 28, 428-430*
- Liu, P.; Lee, K.; Yii, K.; Kou, G. & Chen, S.  
News & notes: Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased Kuruma Prawns *Penaeus japonicus*  
*Curr Microbiol, 1996, 33, 129-132*
- Lonetto, M.; Gribskov, M. & Gross, C. A.  
The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships  
*J Bacteriol, 1992, 174, 3843-3849*
- López, C. & Crosa, J.  
Characterization of ferric-anguibactin transport in *Vibrio anguillarum*  
*Biometals, 2007, 20, 393-403*

- M -

- Magariños, B.; Toranzo, A.; Barja, J. & Romalde, J.  
Existence of two geographically-linked clonal lineages in the bacterial fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* evidenced by random amplified polymorphic DNA analysis  
*Epidemiol Infect*, **2000**, *125*, 213-219
- Maiden, M. C. J.; Bygravesdagger, J. A.; FeilDagger, E.; Morelli, G.; Russelldagger, J. E.; Urwin, R.; ZhangDagger, Q.; Zhou, J.; Zurth, K.; Caugant, D. A.; Feaversdagger, I. M.; Achtman, M. & Spratt, B. G.  
Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms  
*PNAS*, **1998**, *95*, 3140-3145
- Makino, K.; Oshima, K.; Kurokawa, K.; Yokoyama, K.; Uda, T.; Tagomori, K.; Iijima, Y.; Najima, M.; Nakano, M.; Yamashita, A.; Kubota, Y.; Kimura, S.; Yasunaga, T.; Honda, T.; Shinagawa, H.; Hattori, M. & Iida, T.  
Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V cholerae*  
*The Lancet*, **2003**, *361*, 743-749
- Mazel, D.; Dychinco, B.; Webb, V. A. & Davies, J.  
A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome  
*Science*, **1998**, *280*, 605-608
- McDougald, D.; Rice, S. A. & Kjelleberg, S.  
SmcR-dependent regulation of adaptive phenotypes in *Vibrio vulnificus*  
*J. Bacteriol*, **2001**, *183*, 758-762
- Meibom, K. L.; Blokesch, M.; Dolganov, N. A.; Wu, C. & Schoolnik, G. K.  
Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*  
*Science*, **2005**, *310*, 1824-1827
- Mermoud, I.; Costa, R.; Ferre, O.; Goarant, C. & Haffner, P.  
'Syndrome 93' in New Caledonian outdoor rearing ponds of *Penaeus stylirostris*: history and description of three major outbreaks  
*Aquaculture*, **1998**, *164*, 323-335
- Miller, M. B.; Skorupski, K.; Lenz, D. H.; Taylor, R. K. & Bassler, B. L.  
Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*  
*Cell*, **2002**, *110*, 303-314
- Milton, D. L.; Norqvist, A. & Wolf-Watz, H.  
Cloning of a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*  
*J bacteriol*, **1992**, *174*, 7235-7244
- Moriarty, D. J. W.  
Disease control in shrimp culture with probiotic bacteria  
*Proceedings of the 8~ International Symposium on Microbial Ecology. Halifax, Canada*, **2000**, 237-243
- Mugnier, C.; Justou, C. & LAC  
La crevette et le syndrome d'été en Nouvelle-Calédonie: quelles réponses physiologiques et immunitaires? Résultats préliminaires du programme Désans  
*In Styli 2003, Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie (in French with English abstract). C. Goarant, C., Herbland, A., Harache, Y., and Mugnier, C. (eds). Acte de Colloque*, **2004**, 85-92
- Munoz, M.; Cedeno, R.; Rodriguez, J.; van der Knaap, W. P. W.; Mialhe, E. & Bachere, E.  
Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*  
*Aquaculture*, **2000**, *191*, 89-107
- Munoz, M.; Vandenbulcke, F.; Garnier, J.; Gueguen, Y.; Bulet, P.; Saulnier, D. & Bachère, E.  
Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* to a pathogenic vibrio  
*Cell Mol Life Sci*, **2004**, *61*, 961-972

Munro, J.; Oakey, J.; Bromage, E. & Owens, L.  
Experimental bacteriophage-mediated virulence in strains of *Vibrio harveyi*  
*Dis Aquat Organ*, **2003**, *54*, 187-194

- N -

Nagamune, K.; Yamamoto, K.; Naka, A.; Matsuyama, J.; Miwatani, T. & Honda, T.  
In vitro proteolytic processing and activation of the recombinant precursor of El Tor cytolysin/hemolysin (pro-HlyA) of *Vibrio cholerae* by soluble hemagglutinin/protease of *V. cholerae*, trypsin, and other proteases  
*Infect Immun*, **1996**, *64*, 4655-4658

Nei, M.  
Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals  
*Genetics*, **1978**, *89*, 583-590

Nelson, K. E.; Clayton, R. A.; Gill, S. R.; Gwinn, M. L.; Dodson, R. J.; Haft, D. H.; Hickey, E. K.; Peterson, J. D.; Nelson, W. C.; Ketchum, K. A.; McDonald, L.; Utterback, T. R.; Malek, J. A.; Linher, K. D.; Garrett, M. M.; Stewart, A. M.; Cotton, M. D.; Pratt, M. S.; Phillips, C. A.; Richardson, D.; Heidelberg, J.; Sutton, G. G.; Fleischmann, R. D.; Eisen, J. A.; White, O.; Salzberg, S. L.; Smith, H. O.; Venter, J. C. & Fraser, C. M.  
Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*  
*Nature*, **1999**, *399*, 323-329

Nishizawa, T.; Asayama, M.; Fujii, K.; Harada, K. & Shirai, M.  
Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp  
*J Biochem*, **1999**, *126*, 520-529

Novak, P. & Dev, I. K.  
Degradation of a signal peptide by protease IV and oligopeptidase A  
*J Bacteriol*, **1988**, *170*, 5067-5075

- O -

O'Connell, K.; Raffel, S.; Saville, B. & Handelsman, J.  
Mutants of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 that do not induce chlorosis in plants  
*Microbiology*, **1998**, *144*, 2607-2617

Oakey, H. & Owens, L.  
A new bacteriophage, VHML, isolated from a toxin-producing strain of *Vibrio harveyi* in tropical Australia  
*J Appl Microbiol*, **2000**, *89*, 702-709

Ochman, H.; Lawrence, J. G. & Groisman, E. A.  
Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation  
*Nature*, **2000**, *405*, 299-300

Okada, K.; Iida, T.; Kita-Tsukamoto, K. & Honda, T.  
Vibrios commonly possess two chromosomes  
*J Bacteriol*, **2005**, *187*, 752-757

Okujo, N.; Saito, M.; Yamamoto, S.; Yoshida, T.; Miyoshi, S. & Shinoda, S.  
Structure of vulnibactin, a new polyamine-containing siderophore from *Vibrio vulnificus*  
*BioMetals*, **1994**, *7*, 109-116

Oliver, J.  
*Vibrio vulnificus*  
*The biology of Vibrio*, **2006**, ASM press, 349-366

Osek, J.; Svennerholm, A. M. & Holmgren, J.  
Protection against *Vibrio cholerae* El Tor infection by specific antibodies against mannose-binding hemagglutinin pili  
*Infect Immun*, **1992**, *60*, 4961-4964

Osorio, C. R. & Klose, K. E.  
A Region of the Transmembrane Regulatory Protein ToxR That Tethers the Transcriptional Activation Domain to the Cytoplasmic Membrane Displays Wide Divergence among *Vibrio* Species  
*J Bacteriol*, **2000**, *182*, 526-528

Owens, L. & Busico-Salcedo, N.  
*Vibrio harveyi*: Pretty problems in paradise  
*The biology of Vibrios ASM press*, **2006**, 266-280

- P -

Pedersen, K.; Tiainen, T. & Larsen, J.  
Plasmid profiles, restriction fragment length polymorphisms and O-serotypes among *Vibrio anguillarum* isolates  
*Epidemiol Infect.*, **1996**, *117*, 471-478

Pedersen, K.; Grisez, L.; Houdt, R. v.; Tiainen, T.; Ollevier, F. & Larsen, J. L.  
Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups  
*Curr Microbiol*, **1999**, *38*, 183-189

Perolat, P.; Merien, F.; Ellis, W. A. & Baranton, G.  
Characterization of *Leptospira* isolates from serovar hardjo by ribotyping, arbitrarily primed PCR, and mapped restriction site polymorphisms  
*J Clin Microbiol*, **1994**, *32*, 1949-1957

Perry, R. D.  
Signature-tagged mutagenesis and the hunt for virulence factors  
*Trends Microbiol*, **1999**, *7*, 385-388

Planet, P.; Kachlany, S.; Fine, D.; DeSalle, R. & Figurski, D.  
The Widespread Colonization Island of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*  
*Nat Genet*, **2003**, *34*, 193-198

Purdy, A.; Rohwer, F.; Edwards, R.; Azam, F. & Bartlett, D. H.  
A glimpse into the expanded genome content of *Vibrio cholerae* through identification of genes present in environmental strains  
*J bacteriol*, **2005**, *187*, 2992-3001

- R -

Reckseidler, S. L.; DeShazer, D.; Sokol, P. A. & Woods, D. E.  
Detection of bacterial virulence genes by Subtractive Hybridization: Identification of capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* as a major virulence determinant  
*Infect Immun*, **2001**, *69*, 34-44

Reidl, J. & Klose, K. E.  
*Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host  
*FEMS Microbiol Rev*, **2002**, *26*, 125-139

Ritchie, K. B.  
Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria  
*Mar Ecol Prog Ser*, **2006**, *322*, 1-14

Robertson, P. A. W.; Calderon, J.; Carrera, L.; Stark, J. R.; Zherdmant, M. & Austin, B.  
Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae  
*Dis Aquat Organ*, **1998**, 32, 151-155

Rosenberg, E. & Ben-Haim, Y.  
Microbial diseases of corals and global warming  
*Environ Microbiol*, **2002**, 4, 318-326

Rosenberg, E. & Falkovitz, L.  
The *Vibrio shiloi*/*Oculina patagonica* model system of coral bleaching  
*Annual rev microbiol*, **2004**, 58, 143-159

Rosenberg, E. & Koren, O.  
Vibrios in coral health and disease  
*Biology of Vibrios ASM press*, **2006**, 231-238

Rosenberg, E.; Koren, O.; Reshef, L.; Efrony, R. & Zilber-Rosenberg, I.  
The role of microorganisms in coral health, disease and evolution  
*Nat Rev Micro*, **2007**, 5, 355-362

Rowe-Magnus, D. A. & Mazel, D.  
Resistance gene capture  
*Curr Opin Microbiol*, **1999**, 2, 483-488

Rowe-Magnus, D. A. & Mazel, D.  
Integrans: natural tools for bacterial genome evolution  
*Curr Opin Microbiol*, **2001**, 4, 565-569

Ruby, E. G.; Urbanowski, M.; Campbell, J.; Dunn, A.; Faini, M.; Gunsalus, R.; Lostroh, P.; Lupp, C.; McCann, J.; Millikan, D.; Schaefer, A.; Stabb, E.; Stevens, A.; Visick, K.; Whistler, C. & Greenberg, E. P.  
Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: A symbiotic bacterium with pathogenic congeners  
*PNAS*, **2005**, 102, 3004-3009

Ruimy, R.; Breittmayer, V.; Elbaze, P.; Lafay, B.; Boussemart, O.; Gauthier, M. & Christen, R.  
Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences  
*Int J Syst Bacteriol*, **1994**, 44, 416-426

- S -

Sack, D. A.; Sack, R. B.; Nair, G. B. & Siddique, A.  
Cholera  
*The Lancet*, **2004**, 363, 223-233

Saenz, H. L. & Dehio, C.  
Signature-tagged mutagenesis: technical advances in a negative selection method for virulence gene identification  
*Curr Opin Microbiol*, **2005**, 8, 612-619

Sakai, T.; Hirae, T.; Yuasa, K.; Kamaishi, T.; Matsuyama, T.; Miwa, S.; Oseko, N. & Iida, T.  
Mass mortality of cultured Kuruma Prawn *Penaeus japonicus* caused by *Vibrio nigripulchritudo*  
*Fish Pathol*, **2007**, 42, 141-147

Sambrook, J. & Russel, D. W.  
Molecular Cloning. A laboratory manual  
*Cold Spring Harbor press*, **2001**

Saulnier, D.; Avarre, J.; Moullac, G. L.; Ansquer, D.; Levy, P. & Vonau, V.  
Rapid and sensitive PCR detection of *Vibrio penaeicida*, the putative etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonia  
*Dis Aquat Organ*, **2000**, 40, 109-115

- Saulnier D.; Goarant C.; Charlier J.; Ansquer D.; Levy P.; Labreuche Y.; De Lorgeril J.; Bachère E.; Aguirre-Guzman, G. & Cochenec-Laureau N.  
Apports d'un modèle d'infection expérimentale de crevettes naïves pour l'étude d'une vibriose.  
*In : Actes de colloque, Nouméa-Koné, 26 juin 2004 : Styli 2003 Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie, C. Goarant, Harache Y., Herbland & C. Mugnier (Eds). Acte de colloque, 2004, 216-222*
- Sawada, K.; Kokeguchi, S.; Hongyo, H.; Sawada, S.; Miyamoto, M.; Maeda, H.; Nishimura, F.; Takashiba, S. & Murayama, Y.  
Identification by subtractive hybridization of a novel insertion sequence specific for virulent strains of *Porphyromonas gingivalis*  
*Infect Immun, 1999, 67, 5621-5625*
- Sbordoni, V.; De Matthaeis, E.; Cobolli Sbordoni, M.; La Rosa, G. & Mattoccia, M.  
Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda)  
*Aquaculture, 1986, 57, 239-251*
- Shain, H.; Homer, K. & Beighton, D.  
Degradation and utilisation of chondroitin sulphate by *Streptococcus intermedius*  
*J Med Microbiol., 1996, 44, 372-380*
- Sharp, P. & Matassi, B.  
Codon usage and genome evolution.  
*Curr Opin Genet Dev, 1994, 4, 851-860*
- Schatz, D.; Keren, Y.; Vardi, A.; Sukenik, A.; Carmeli, S.; Borner, T.; Dittmann, E. & Kaplan, A.  
Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins  
*Environl Microbiol, 2007, 9, 965-970*
- Schumacher, M. A.  
Structural biology of plasmid segregation proteins  
*Curr Opin StructBiol, , 2007, 17, 103-109*
- Sheahan, K.; Cordero, C. L. & Fullner Satchell, K. J.  
Identification of a domain within the multifunctional *Vibrio cholerae* RTX toxin that covalently cross-links actin  
*PNAS, 2004, 101, 9798-9803*
- Shine, J. & Dalgarno, L.  
Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes  
*Nature, 1975, 254, 34-38*
- Shinoda, S.; Kobayashi, M.; Yamada, H.; Yoshida, S.; Ogawa, M. & Mizuguchi, Y.  
Inhibitory effect of capsular antigen of *Vibrio vulnificus* on bactericidal activity of human serum  
*Microbiol Immunol, 1987, 31, 393-401*
- Simpson, L. M.; White, V. K.; Zane, S. F. & Oliver, J. D.  
Correlation between virulence and colony morphology in *Vibrio vulnificus*  
*Infect Immun, 1987, 55, 269-272*
- Smith, A. J.; Greenman, J. & Embery, G.  
Detection and possible biological role of chondroitinase and heparitinase enzymes produced by *Porphyromonas gingivalis* W50  
*J Periodontal Res, 1997, 32, 1-8*
- Snieszko, S. F.  
The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes  
*J Fish Biol, 1973, 6, 197-208*
- Song, Y.; Cheng, W. & Wang, C.  
Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infectious for cultured shrimp in Taiwan  
*J Invertebr Pathol, 1993, 61, 24-31*

- Sørum, H.; Hvaal, A. B.; Heum, M.; Daae, F. L. & Wiik, R.  
Plasmid profiling of *Vibrio salmonicida* for epidemiological studies of cold-water vibriosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and cod (*Gadus morhua*)  
*Appl Environ Microbiol*, **1990**, *56*, 1033-1037
- Soto-Rodriguez, S.; Roque, A.; Lizarraga-Partida, M.; Guerra-Flores, A. & Gomez-Gill, B.  
Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana* nauplii  
*Dis Aquat Organ*, **2003**, *53*, 231-240
- Sreevatsan, S.; Pan, X.; Stockbauer, K. E.; Connell, N. D.; Kreiswirth, B. N.; Whittam, T. S. & Musser, J. M.  
Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination  
*PNAS*, **1997**, *94*, 9869-9874
- Stackebrandt, E. & Embley, T.  
Diversity of uncultured microorganisms in the environment.  
*In: R.R. Cowell and D.J. Grimes, Editors, Nonculturable Microorganisms in the Environments, ASM, Washington, DC, 2000*, 55-57
- Stackebrandt, E.; Frederiksen, W.; Garrity, G. M.; PAD. Grimont, P.; Kampfer; Maiden, M.; Nesme, X.; Rossello-Mora, R.; Swings, J.; Truper, H. G.; Vauterin, L.; Ward, A. C. & Whitman, W. B.  
Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology  
*Int J Syst Evol Microbiol*, **2002**, *52*, 1043-1047
- Stein, L. Y.; Arp, D. J.; Berube, P. M.; Chain, P. S. G.; Hauser, L.; Jetten, M. S. M.; Klotz, M. G.; Larimer, F. W.; Norton, J. M.; Op den Camp, H. J. M.; Shin, M. & Wei, X.  
Whole-genome analysis of the ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas eutropha* C91: implications for niche adaptation  
*Environ Microbiol*, **2007**, *9*, 2993-3007
- Stork, M.; Di Lorenzo, M.; Welch, T. J.; Crosa, L. M. & Crosa, J. H.  
Plasmid-mediated iron uptake and virulence in *Vibrio anguillarum*  
*Plasmid*, **2002**, *48*, 222-228
- Stork, M.; Di Lorenzo, M.; Mourino, S.; Osorio, C. R.; Lemos, M. L. & Crosa, J. H.  
Two tonB systems function in iron transport in *Vibrio anguillarum*, but only one is essential for virulence  
*Infect Immun*, **2004**, *72*, 7326-7329
- Szmant, A. & Gassman, N. J.  
The effects of prolonged "bleaching" on the tissue biomass and reproduction of the reef coral *Montastrea annularis*  
*Coral Reefs*, **1990**, *8*, 217-224
- T -
- Tacket, C.; Losonsky, G.; Nataro, J.; Cryz, S.; Edelman, R.; Fasano, A.; Michalski, J. & Levine, J. K. M.  
Safety and immunogenicity of live oral cholera vaccine candidate CVD 110, a delta ctxA delta zot delta ace derivative of El Tor Ogawa *Vibrio cholerae*  
*J Infect Dis*, **1993**, *168*, 1536-1540
- Tacket, C. O.; Taylor, R. K.; Losonsky, G.; Lim, Y.; Nataro, J. P.; Kaper, J. B. & Levine, M. M.  
Investigation of the roles of Toxin-Coregulated Pili and Mannose-Sensitive Hemagglutinin Pili in the pathogenesis of *Vibrio cholerae* O139 infection  
*Infect Immun*, **1998**, *66*, 692-695
- Tall, B. D.; Fall, S.; Pereira, M. R.; Ramos-Valle, M.; Curtis, S. K.; Kothary, M. H.; Chu, D. M. T.; Monday, S. R.; Kornegay, L.; Donkar, T.; Prince, D.; Thunberg, R. L.; Shangraw, K. A.; Hanes, D. E.; Khambaty, F. M.; Lampel, K. A.; Bier, J. W. & Bayer, R. C.  
Characterization of *Vibrio fluvialis*-like strains implicated in Limp Lobster Disease  
*Appl Environ Microbiol*, **2003**, *69*, 7435-7446

Taylor, D.; Killeen, K.; Hack, D.; Kenner, J.; Coster, T.; Beattie, D.; Ezzell, J.; Hyman, T.; Trofa, A. & Sjogren, M.

Development of a live, oral, attenuated vaccine against El Tor cholera  
*J Infect Dis*, **1994**, *170*, 1518-1523

Thompson, J. D.; Higgins, D. G. & Gibson, T. J.

CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice  
*Nucl Acids Res*, **1994**, *22*, 4673-468

Thompson, F.; Hoste, B.; Thompson, C.; Huys, G. & Swings, J.

The coral bleaching *Vibrio shiloi* Kushmaro et al. 2001 is a later synonym of *Vibrio mediterranei* Pujalte and Garay 1986  
*Syst Appl Microbiol*, **2001**, *24*, 516-519

Thompson, F. L.; Iida, T. & Swings, J.

Biodiversity of Vibrios  
*Microbiol Mol Biol Rev*, **2004**, *68*, 403-431

Thompson, C. C.; Thompson, F. L.; Vandemeulebroecke, K.; Hoste, B.; Dawyndt, P. & Swings, J.

Use of recA as an alternative phylogenetic marker in the family Vibrionaceae  
*Int J Syst Evol Microbiol*, **2004**, *54*, 919-924

Thompson, F. L.; Austin, B. & Swing, J.

The biology of Vibrios  
*ASM Press*, **2006**

Tomich, M.; Planet, P. J. & Figurski, D. H.

The tad locus: postcards from the widespread colonization island  
*Nat Rev Micro*, **2007**, *5*, 363-375

Toren, A.; Landau, L.; Kushmaro, A.; Loya, Y. & Rosenberg, E.

Effect of temperature on adhesion of *Vibrio* strain AK-1 to *Oculina patagonica* and on coral bleaching  
*Appl Environ Microbiol*, **1998**, *64*, 1379-1384

Trost, M.; Wehmhöner, D.; Kärst, U.; Dieterich, G.; Wehland, J. & Jänsch, L.

Comparative proteome analysis of secretory proteins from pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species  
*Proteomics*, **2005**, *5*, 1544-1557

Trucksis, M.; Michalski, J.; Deng, Y. K. & Kaper, J. B.

The *Vibrio cholerae* genome contains two unique circular chromosomes  
*PNAS*, **1998**, *95*, 14464-14469

- U -

Urwin, R. & Maiden, M. C. J.

Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology  
*Trends Microbiol*, **2003**, *11*, 479-487

- V -

Vandamme, P.; Pot, B.; Gillis, M.; de Vos, P.; Kersters, K. & Swings, J.

Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics  
*Microbiol rev*, **1996**, *60*, 407-438

Vazquez, J.; Gonzalez, M. & Murado, M.

Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish  
*Aquaculture*, **2005**, *245*, 149-161

Verschuere, L.; Heang, H.; Criel, G.; Sorgeloos, P. & Verstraete, W.  
Selected bacterial strains protect *Artemia* spp. from the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2  
*Appl Environ Microbiol*, **2000**, *66*, 1139-1146

- W -

Waldor, M.; Colwell, R. & Mekalanos, J.  
The *Vibrio cholerae* O139 serogroup antigen includes an O-antigen capsule and lipopolysaccharide virulence determinants  
*PNAS*, **1994**, *91*, 11388-11392

Waldor, M.; Tschape, H. & Mekalanos, J.  
A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139  
*J Bacteriol*, **1996**, *178*, 4157-4165

Waldor, M. K. & RayChaudhuri, D.  
Bacterial genomics: Treasure trove for cholera research  
*Nature*, **2000**, *406*, 469-470

Ward, J. R. & Lafferty, K. D.  
The elusive baseline of marine disease: Are diseases in ocean ecosystems increasing?  
*PLoS Biol*, **2004**, *2*, 542-547

Welsh, J. & McClelland, M.  
Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers  
*Nucl Acids Res*, **1990**, *18*, 7213-7218

Welsh, J.; Pretzman, C.; Postic, D.; Saint Girons, I.; Baranton, G. & McClelland, M.  
Genomic fingerprinting by arbitrarily primed polymerase chain reaction resolves *Borrelia burgdorferi* into three distinct phyletic groups  
*Int J Syst Bacteriol*, **1992**, *42*, 370-377

Weppe, M.; Bonami, J. & Lightner, D.  
Demostración de la altas cualidades de la cepa de *P. stylirostris* (AQUACOP SPR 43) resistente al virus IHNN  
*in: Escuela Superior Politécnica del Litoral (Eds.), Memorias I Congreso Ecuatoriano de acuicultura, Guayaquil*, **1993**, 229-232

Weston, D P; Baird, D; M V M Beveridge; Kelly, L A & Muir, J F  
Environmental considerations in the use of antibacterial drugs in aquaculture  
*Blackwell (Ed): Aquaculture and Water Resource Management*, **1996**, 140-145

Wolf, Y. I.; Aravind, L. & Koonin, E. V.  
Rickettsiae and Chlamydiae: evidence of horizontal gene transfer and gene exchange  
*Trends Genet*, **1999**, *15*, 173-175

Wood, J. M.  
Osmosensing by Bacteria  
*Sci STKE*, **2006**, *2006*, 43

Wright, A. C.; Simpson, L. M.; Oliver, J. D. & Morris, J.  
Phenotypic evaluation of acapsular transposon mutants of *Vibrio vulnificus*  
*Infect Immun*, **1990**, *58*, 1769-1773

Wright, A. C. & Morris, J.  
The extracellular cytolysin of *Vibrio vulnificus*: inactivation and relationship to virulence in mice  
*Infect Immun*, **1991**, *59*, 192-197

- Y -

Yamaichi, Y.; Iida, T.; Park, K.; Yamamoto, K. & Honda, T.  
Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*: presence of two chromosomes in *Vibrio* species  
*Mol Microbiol*, **1999**, *31*, 1513-1521

Yamamoto, S. & Harayama, S.  
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*, **1995**, *61*, 1104-1109

Yamasaki, S.; Shimizu, T.; Hoshino, K.; Ho, S.; Shimada, T.; Nair, G. B. & Takeda, Y.  
The genes responsible for O-antigen synthesis of *Vibrio cholerae* O139 are closely related to those of *Vibrio cholerae* O22  
*Gene*, **1999**, *237*, 321-332

Yeh, F. & Boyle, T.  
Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits  
*Belg J Bot*, **197**, *129*, 157

Yoshida, S.; Ogawa, M. & Mizuguchi, Y.  
Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*  
*Infect Immun*, **1985**, *47*, 446-451

- Z -

Zhang, X. & Austin, B.  
Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids  
*J Fish Dis*, **2000**, *23*, 93-102

Zhang, Y. L.; Ong, C. T. & Leung, K. Y.  
Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish  
*Microbiology*, **2000**, *146*, 999-1009



---

# ANNEXES

---

## **Annexe I - Article I**

Publié dans Systematic and Applied Microbiology en 2006

**“Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia.”**

## Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia

Cyrille Goarant<sup>a,\*</sup>, Yann Reynaud<sup>a,b</sup>, Dominique Ansquer<sup>a</sup>, Sophie de Decker<sup>a</sup>, Denis Saulnier<sup>b</sup>, Frédérique le Roux<sup>b</sup>

<sup>a</sup>IFREMER, Département Aquaculture en Nouvelle-Calédonie, BP 2059, 98846 Nouméa cedex, Nouvelle-Calédonie

<sup>b</sup>IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie BP 133, 17390 La Tremblade, France

Received 28 November 2005

### Abstract

A collection of 57 isolates of *Vibrio nigripulchritudo* from either diseased or healthy shrimp and from shrimp farms environment was studied in order to gain a better understanding of the epidemiology of this pathogen, notably isolated from two distinct shrimp disease complexes. Molecular typing using two different techniques, arbitrarily primed PCR (AP-PCR) and multi-locus sequence typing (MLST), studied together with experimental pathology data allowed a relevant epidemiological insight into this possibly emerging pathogen. Additionally, results obtained with the two molecular typing techniques were congruent and allowed discriminating the strains associated with the “Summer Syndrome” from strains isolated from other contexts, especially the other shrimp vibriosis “Syndrome 93”. These results highlight that the “Summer Syndrome” is most probably caused by an emergent clonal pathogen that therefore deserves surveillance and that AP-PCR can satisfactorily be used for that purpose.

© 2005 Elsevier GmbH. All rights reserved.

**Keywords:** Vibriosis; Mariculture; AP-PCR; MLST; Typing; Epidemiology; Virulence

### Introduction

Shrimp aquaculture has been constantly increasing over the last decades, providing now half of the world shrimp supplies [30]. However, this rapid increase in culture has often been impeded by very severe epizootics [19,34]. Worldwide, viruses are major problems, being responsible for the most spectacular losses among shrimp [23,33]. However, vibriosis is also an important disease among penaeid shrimp [3,21,22,26,36], but this has yet only received little research attention. Therefore, limited knowledge has been gained on these pathologies

and little is known concerning the epidemiology of *Vibrio* spp that are pathogenic to farmed shrimp.

New Caledonia (a 450 × 50 km wide island in the South Pacific between 19°S and 23°S) is a small producer regarding world global trade. However, this industry has gained considerable economic importance in the last three decades, now representing the second major export sector of the country. Actually, the shrimp farming industry has major advantages, namely a tropical oceanic climate, a domesticated *Litopenaeus stylirostris* line reared in closed cycle for almost 25 years, an almost virus-free status, infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) being the only known virus present and the domestic stock of *L. stylirostris* being resistant to it [40]. Yet this industry

\*Corresponding author. Tel.: +687 28 51 71; fax: +687 28 78 57.

E-mail address: [Cyrille.Goarant@ifremer.fr](mailto:Cyrille.Goarant@ifremer.fr) (C. Goarant).

is based on a unique domesticated but non-indigenous species, *L. stylirostris*. So the emergence of an infectious disease would threaten its profitability and sustainability. In such a context, it is of prime importance to detect the emergence of pathogenic infectious agents as early as possible and to understand the mechanisms of infection in order to be able to control the disease.

Actually, New Caledonian shrimp farming has been affected since 1993 by a cool season vibriosis causing high mortalities in juvenile shrimp reared in earthen ponds, that was shown to be caused by *Vibrio penaeicida* and was named Syndrome 93 [6,12,25,31]. During Syndrome 93 epizootics, a few other *Vibrio* strains could be isolated from moribund shrimp septicemic hemocultures, including *V. nigripulchritudo* [6] that demonstrated to be highly pathogenic by experimental infection in healthy *L. stylirostris* [15]. These pathogenic strains were, at that time, geographically restricted to two adjoining farms within one bay [14] and therefore, zoosanitary recommendations were given in order to minimize the risk of disease spread. The industry's strategy has since been to avoid winter crops, thus limiting the impact of Syndrome 93. However *V. nigripulchritudo* was yet isolated in late December 1997 from moribund shrimp obtained from two ponds at one farm located 50 km south of the original isolation. The organism was also causing an epizootic due to systemic vibriosis [11], but in high water temperature conditions that did not fit the classical Syndrome 93 epidemiology, which typically occurs at lower water temperatures [13,25]. This new disease, which was named "Summer Syndrome" has affected all summer crops on this farm ever since. Since 2002, it also affected a new farm built in the close proximity of the affected one. If it was to affect all shrimp farms, the profitability of the industry would be seriously threatened.

The facts that (i) *V. nigripulchritudo* is associated with two distinct shrimp diseases and (ii) that one of these ("Summer Syndrome") is possibly an emergent disease highlight the need for accurate epidemiological data to gain appropriate knowledge and to propose adequate sanitary surveillance. Phenotypic identification of *V. nigripulchritudo* is easily conducted by traditional methods, but lacks a sufficient discriminating power for epidemiological studies. Therefore, the genetic structure of a New Caledonian *V. nigripulchritudo* collection has been studied using two molecular typing methods over a selection of 58 *V. nigripulchritudo* strains. The two methods used were MLST [24], and AP-PCR [39]. Results were analysed together with virulence patterns of the strains that had been previously determined [15]. Here, we describe the results of this study, compare the two molecular typing techniques used, and propose a surveillance scheme of the potential emergence of this new pathogen for the shrimp aquaculture industry of New Caledonia.

## Materials and methods

### Bacterial strains and geographical data

Both the type strain and wild-type isolates of *V. nigripulchritudo* were used in this study. *V. nigripulchritudo* CIP 103192<sup>T</sup> (= ATCC 27043) was provided by Collection de l'Institut Pasteur. Fifty-seven wild-type isolates, from both clinical and environmental origins, isolated between May 1995 and November 2003 in 13 different farms and 3 hatcheries along almost 300 km of the New Caledonian West coast were included in this study (Table 1). The origin, identification and virulence of these *V. nigripulchritudo* isolates towards healthy *L. stylirostris* were determined previously [6,14,15] (see Table 1).

The shrimp farms and hatcheries included in the study are located on the southwest coast of New Caledonia (Fig. 1).

Clinical *V. nigripulchritudo* isolates originated from septicemic hemocultures associated with Syndrome 93 (= cool season vibriosis; 3 strains), Summer Syndrome (7 strains), and opportunistic vibriosis, i.e. affecting only a few shrimp under adverse pond conditions and lasting only a limited time (9 strains). Other strains were isolated when found (one or very few colonies) in hemocultures from either healthy shrimp (24 isolates) or moribund shrimp dying from a non-bacterial cause (4 strains). Environmental isolates were isolated from pumping water in a Summer Syndrome affected farm (2 isolates), pond water or sediment pore water in the two Summer Syndrome affected farms (7 strains) and from a healthy crab (*Portunus pelagicus*) carapace swab (1 isolate). Identification to the species level was achieved on the basis of phenotyping tests and specific PCR confirmation as described elsewhere [15]. Additionally, *V. penaeicida* strain AM101 [6,13,14], isolated in a Syndrome 93 context was included in this study, as an outgroup for phylogenetic analysis.

Out of these 59 strains, 25 were used for the MLST approach, including *V. nigripulchritudo* type strain and *V. penaeicida* AM101 as an outgroup (see Table 1). All of these 25 strains are deposited in the bacterial collection of the CRB (Centre de Ressources Biologiques, Laboratoire de Génétique et Pathologie, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER [IFREMER], La Tremblade, France).

### Culture conditions and extraction of bacterial genomic DNAs

*Vibrio* strains stored frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  in Marine Broth 2216E (Difco) with 17% glycerol were cultured in accordance with standard procedures [1], i.e. grown in Marine Broth 2216E (Difco) at  $30^{\circ}\text{C}$  with continuous

**Table 1.** *Vibrio nigripulchritudo*-type strain and field isolates used in this study

Strain name	Date of isolation	Context	Virulence to <i>L. stylirostris</i> <sup>a</sup>	MLST	References
CIP 103195 <sup>T</sup>		<i>V. nigripulchritudo</i> type strain	N	X	
AM102	May 1995	S93, moribund shrimp hemoculture	V	X	[6,14]
AM 115	May 1995	S93, moribund shrimp hemoculture	V	X	[6,14]
SO65	May 1995	S93, moribund shrimp hemoculture	V	X	[6,14]
SFn1	March 2000	Summer syndrome, moribund shrimp hemoculture	V	X	[15]
SFn2	March 2000	Summer syndrome, moribund shrimp hemoculture	V		[15]
SFn27	December 2000	Sediment pore water, diseased pond	V	X	[15]
SFn48	November 2001	Summer syndrome, moribund shrimp hemoculture	V		[15]
SFn49	November 2001	Growout pond water, diseased pond	V		[15]
SFn105	February 2002	Growout pond water, diseased pond	V		[15]
SFn106	February 2002	Summer syndrome, moribund shrimp hemoculture	V		[15]
SFn111	March 2002	Carapace of a healthy crab ( <i>Portunus pelagicus</i> ), diseased farm			[15]
SFn115	March 2002	Lagoon water in front of pumps, diseased farm		X	[15]
SFn118	April 2002	Lagoon water in front of pumps, diseased farm	N	X	[15]
SFn127	November 2002	Healthy shrimp hemoculture, before disease outbreak	V		[15]
SFn128	December 2002	Summer syndrome, moribund shrimp hemoculture	V		[15]
SFn135	December 2002	Growout pond water, diseased pond	V	X	[15]
AgMn1	October 2003	Healthy shrimp hemoculture, before disease outbreak (same animal)	N	X	[15]
AgMn2			N		[15]
AgMn3			N		[15]
AgMn7	November 2003	Healthy shrimp hemoculture, before disease outbreak	V		[15]
AgMn8	November 2003	Summer syndrome, moribund shrimp hemoculture	V		[15]
AgMn9	November 2003	Growout pond water, diseased pond	V		[15]
AgMn10	November 2003	Summer syndrome, moribund shrimp hemoculture	V		[15]
AgMn12	November 2003	Sediment pore water, diseased pond	V		[15]
AgMn13	November 2003	Sediment pore water, diseased pond	V		[15]
POn2	April 2002	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond 2, healthy farm	V		[15]
POn3	April 2002	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond 3, same healthy farm	V	X	[15]
POn4	April 2002	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond 6, same healthy farm	N	X	[15]
POn10	December 2002	Moribund shrimp hemoculture, no vibriosis, healthy pond 5, same healthy farm	N		[15]
POn12	December 2002	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond 4, same healthy farm	N	X	[15]
POn13	December 2002	Healthy shrimp hemoculture, same healthy pond 4, same healthy farm	N	X	[15]
POn19	January 2003	Healthy shrimp hemoculture, same healthy pond 4, same healthy farm	V	X	[15]
AMn3	March 2003	Moribund shrimp hemoculture, opportunistic vibriosis	V	X	[15]

**Table 1.** (continued)

Strain name	Date of isolation	Context	Virulence to <i>L. stylirostris</i> <sup>a</sup>	MLST	References
CIP 103195 <sup>T</sup>	<i>V. nigripulchritudo</i> type strain		N	X	
AMn4	March 2003	Moribund shrimp hemoculture, opportunistic vibriosis, same episode	V		[15]
<i>SOn1</i>	July 2001	Moribund shrimp hemoculture, no vibriosis	N		[15]
<i>SOn2</i>	March 2003	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond, healthy farm	N		[15]
FTn1	January 2001	Moribund shrimp hemoculture, no vibriosis	N		[15]
<i>FTn2</i>	March 2003	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond, healthy farm	V		[15]
<i>SBn2</i>	March 2003	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond, healthy farm	N		[15]
Wn1	January 2001	Moribund shrimp hemoculture, opportunistic vibriosis	V	X	[15]
Wn3	January 2001	Moribund shrimp hemoculture, opportunistic vibriosis	V	X	[15]
Wn13	November 2002	Moribund shrimp hemoculture, opportunistic vibriosis (same animal)	V	X	[15]
Wn14			V		[15]
<i>BDn1</i>	February 2003	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond, healthy farm	V		[15]
<i>BDn2</i>	February 2003	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond, healthy farm	V		[15]
<i>Fn1</i>	February 2003	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond, healthy farm	V		[15]
<i>Fn2</i>	February 2003	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond, healthy farm	N	X	[15]
<i>AQn1</i>	March 2003	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond, healthy farm	V	X	[15]
<i>AQn2</i>	March 2003	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond, healthy farm	V		[15]
MT1	January 2000	Moribund shrimp hemoculture, opportunistic vibriosis, broodstock	V		[15]
BLFn1	March 2001	Moribund shrimp hemoculture, opportunistic vibriosis	V	X	[15]
BLFn2	December 2001	Moribund shrimp hemoculture, opportunistic vibriosis	V		[15]
<i>ENn1</i>	June 2000	Healthy shrimp hemoculture, healthy broodstock	N		[15]
<i>ENn2</i>	June 2000	Healthy shrimp hemoculture, healthy broodstock	V	X	[15]
SVn2	April 2002	Moribund shrimp hemoculture, no vibriosis	N		[15]
<i>SVn3</i>	February 2003	Healthy shrimp hemoculture, healthy farm	N	X	[15]
<i>ESn2</i>	June 2000	Healthy shrimp hemoculture, healthy broodstock	N		[15]
<i>V. penaeicida</i> AM 101	May 1995	Moribund shrimp hemoculture, Syndrome 93	V	X	[15]

**Bold:** Isolates from farms which are affected by the Summer Syndrome.

*Italics:* Isolates collected during surveys specifically dedicated to the isolation of *V. nigripulchritudo* strains.

Virulence as determined in text: V stands for virulent and N for Non-virulent.

The names of wild-type isolates refer to the initials of the grow out farms and hatcheries as mentioned on the map in Fig. 1.

<sup>a</sup>Virulence data from Goarant et al. [15].

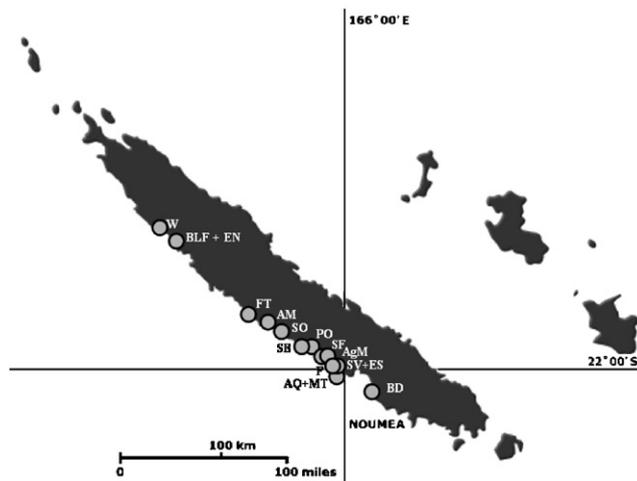
shaking until the stationary phase of growth was reached, i.e. usually 18 h. DNAs were extracted and purified as described elsewhere [18].

## AP-PCR

Fingerprinting was performed as described previously [14]. Primers RSP and SP (see Table 2) were purchased from Proligo (Singapore). Fifty-microlitre reaction mixtures were prepared with 100 ng of DNA–1 × *Taq* polymerase buffer–MgCl<sub>2</sub> 4 mM–0.2 mM each deoxy-

nucleoside triphosphate (Sigma laboratories) –1.25 U of DNA polymerase (Qiagen). Amplification reactions were cycled twice in a 60-well Gene-Amp 9700 thermocycler (Applied BioSystems) through a low-stringency temperature profile and then 40 times through a high-stringency temperature profile as previously described [29]. Ten microlitres of each reaction mixture was combined with 2 µl loading buffer and loaded onto a 2% agarose gel with 1 × TBE (90 mM Tris-borate, 2 mM EDTA), and electrophoresis was performed at 40 V overnight. After ethidium bromide staining, the gel was then photographed under UV trans-illumination. In accordance with Welsh and McClelland [39], only major bands were considered in the analysis as share-derived characters, and this allowed the construction of a key for type grouping of the strains according to the amplicons produced with a given primer.

Major bands were considered as present (1) or absent (0) in each fingerprint. All major bands for both primers were put together in a single analysis. The resulting matrix was analysed using the PopGene 16 freeware [41] to build a dendrogram based on Nei's genetic distances [27].



**Fig. 1.** Map of New Caledonian shrimp farms and hatcheries mentioned in this study. Initials ES, EN and MT refer to hatcheries, whereas all the others refer to grow out farms.

## Multi locus sequence typing

Six genes were considered for the MLST approach: 16S rDNA, *gyrB*, *rpoD*, *rctB*, *toxR* and *recA* [20,37]. Primers sequences and annealing temperatures according to gene are given in Table 2. The amplicons with the expected size were purified using a Qiaex II Gel

**Table 2.** Nucleotidic sequences of the primers

Gene	Primers sequence	Annealing temp. (°C)
<i>rrs</i>	Forward 5'- <i>CAGGAAACAGCTATGACCAGAGTTTGATCATGGCTCAGA</i> -3' Reverse 5'- <i>GTAAAACGACGGCCAGGTTACCTTGTTACGACTT</i> -3'	50
<i>gyrB</i>	F 5'- <i>GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNNGGNAARTTYRA</i> -3' R 5'- <i>AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCACRTCNCRCTCNGYCAT</i> -3'	58
<i>rpoD</i>	F 5'- <i>ACGACTGACCCGGTACGCATGTAYATGMGNGARATGGGNACNGT</i> -3' R 5'- <i>ATAGAAATAACCAGACGTAAGTTNGCYTCNACCATYTCYTTYTT</i> -3'	57
<i>rctB</i>	F 5'- <i>CAGGAAACAGCTATGACCATHGARTTYACNGAYTTYCARYTNCAY</i> -3' R 5'- <i>GTAAAACGACGGCCAYTTNCTYTGHATNGGYTCRAAYTCNCCRT</i> -3'	57
<i>toxR</i>	F 5'- <i>CAGGAAACAGCTATGACCGANCARGGNTTYGARGTNGAYGAYTC</i> -3' R 5'- <i>GTAAAACGACGGCCA GTTDKKTGNCNCYNGTVGCDATNAC</i> 3'	57
<i>recA</i>	F 5'- <i>TGGACGAGAATAAACAGAAGGC</i> -3' R 5'- <i>CCGTTATGCTGTACCAAGCGCCC</i> -3'	55
	AP-PCR RSP 5'- <i>GGAAACAGCTATGACCATGA</i> -3'	
	AP-PCR SP 5'- <i>TTGTAAAACGACGGCCAG</i> -3'	

For MLST, the sequence of the primers used in sequencing reaction is indicated in italic. The amplified gene and the annealing temperature are also indicated for each pair of primers.

Extraction Kit (Qiagen). PCR product were then denatured for 2 min at 96 °C and mixed (final volume 10 µl) with 0.4 µl ABI Prism Big Dye Terminator ready reaction mix (Applied Biosystems), forward or reverse primer 0.6 µM and buffer 5 ×. Cycle sequencing reaction was performed using a Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystem), following instruction of the manufacturer. Separation of the DNA fragments was carried out in an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Concatemers of sequences were aligned with Bio-Edit® [16], phylogenetic trees were built using Phylo-win program [9] applied to Neighbour Joining method and Kimura's 2-parameter distances [10]. Reliability of topologies was assessed by the bootstrap method with 1000 replicates.

## Results

### AP-PCR typing

Both primers permitted the amplification of all tested DNA's, giving complex profiles with up to 18 different bands for each strain, over a total of 28 and 26 different amplicon sizes for primers SP and RSP, respectively over the *V. nigripulchritudo* selection. Each strain gave a unique reproducible profile when using the correct amount of genomic DNA for the amplification using the same thermocycler. The complex fingerprint profiles

permitted an intra-specific discrimination between *V. nigripulchritudo* strains (Fig. 2, as an example). When considering only major bands, each fingerprint was scored with 6–12 bands out of 16 for each primer. In order to characterize the outgroup (*V. penaeicida* strain AM101) 6 additional bands were necessary for primer SP and 8 for primer RSP. The analysis, thus relying on a matrix of presence/absence of 46 bands for 59 bacterial strains resulted in constructing a dendrogram, which is presented in Fig. 3.

*V. nigripulchritudo* wild type isolates could be grouped into 4 major clusters (A, B, C and D, see Fig. 3), out of which 2 clusters (A and B) grouped all virulent isolates. Though sub-clusters could be considered in these two clusters, they evidenced a low genetic diversity compared to clusters C and D that contained only non-virulent isolates.

### Multi-locus sequence typing

A total of 3430 bp corresponding to partial sequences of the 6 genes *recA*, *rpoD*, *toxR*, 16S rDNA, *gyrB* and *rctB* were aligned. This permitted the construction of a concatemer phylogenetic tree by Neighbour joining Method and Kimura's 2-parameter distances (Fig. 4). The concatemer resulted in at least 97% overall homology between nucleotidic sequences within the 24 *V. nigripulchritudo* strains studied. The most polymorphic gene proved to be *gyrB* with 95% gene sequence similarity, then 96% for *recA*, 97% for *toxR*,

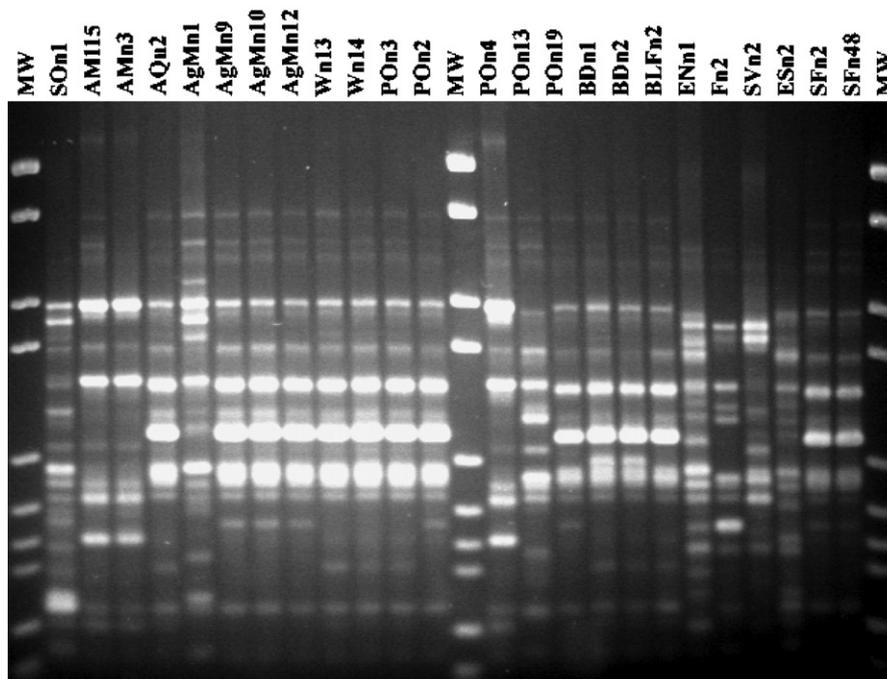
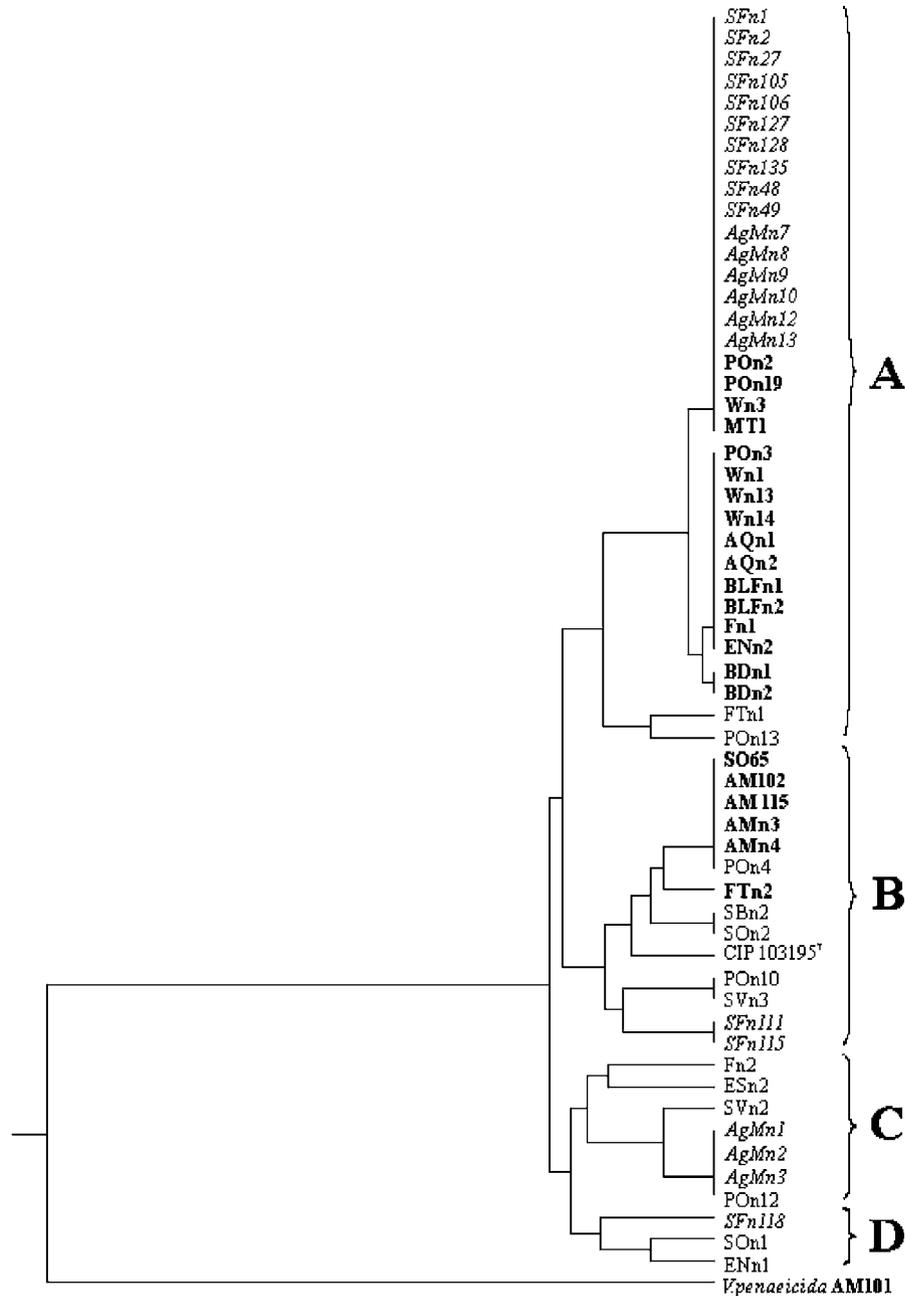


Fig. 2. AP-PCR fingerprints obtained with primer SP from a few *Vibrio nigripulchritudo* wild-type isolates.

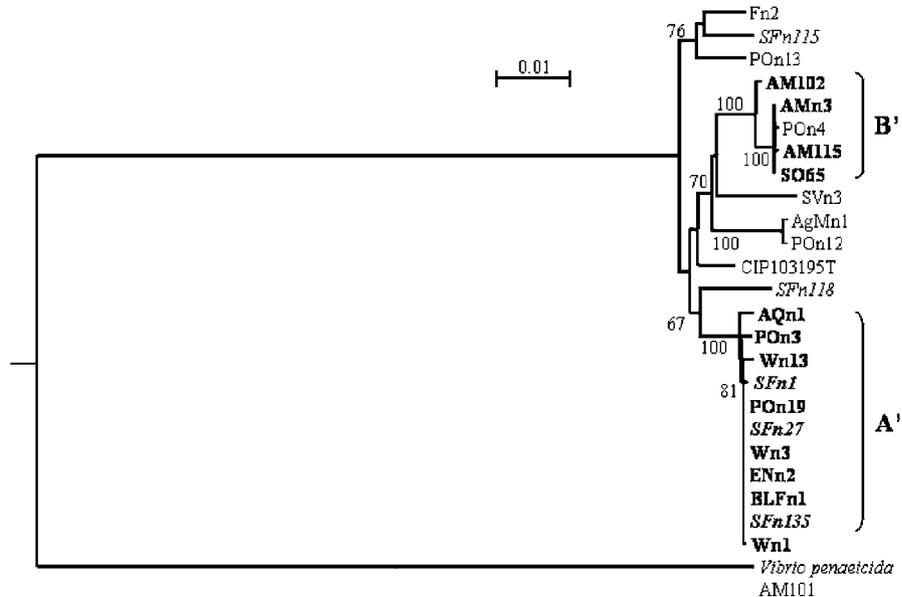


**Fig. 3.** Dendrogram drawn from the presence/absence of major amplicons in each individual AP-PCR fingerprints obtained with primer RSP and SP. Bold: virulent isolates (as determined experimentally, see text), italics: isolates collected from farms which are affected by the Summer Syndrome, cluster names as mentioned in the text.

98% for *rpoD* and *rctB* and 99% for 16S rDNA. Regarding genetic structuring of the sub-selection of strains, one cluster with very low genetic variability groups only strains being virulent to *L. stylirostris* (cluster A'), another cluster, with higher genetic variability whatever gene being considered, groups virulent together with avirulent strains (cluster B'). Lastly, all other non-virulent strains belong to none of these two main clusters.

### Genospecies identification

The sequence similarities obtained in 16S rDNA being all above 99% confirm that all of the 24 strains studied in MLST belong to the species *V. nigripulchritudo*, considering Stackebrandt and Embley [35] who advise a level of intraspecific similarity of  $\geq 98\%$  in 16S rDNA gene sequences. Because at least one strain from each AP-PCR cluster was used for the MLST approach and



**Fig. 4.** Dendrogram constructed from the alignment of 3430 bp sequences of the six genes *recA*, *rpoD*, *toxR*, 16S rDNA, *gyrB* and *rctB* over a sub-selection of the strains, Cluster names as mentioned in the text.

therefore its 16S rDNA gene sequenced, it confirmed the belonging of these isolates to the species *V. nigripulchritudo* [14,15].

## Discussion

Both techniques permitted discriminations and groupings between isolates. MLST and AP-PCR are very powerful DNA typing tool, which have shown a high degree of intraspecies discriminatory power for bacterial pathogens [14,28,29,38]. The overwhelming advantage of MLST is that sequence data are portable and cumulative between laboratories allowing to exchange data for multi-laboratory epidemiological studies. Nevertheless this technique is time consuming and expensive. AP-PCR is easier to develop, requires no prior knowledge of the sequences of the organism to be studied and is an easy and rapid technique. However, it has been shown to present a lack of reproducibility depending on laboratory equipments and practices [2,4,5,8].

Interestingly, the clusters that were evidenced by either technique were consistent. This provides an inter-validation of the results, one technique being based on the sequence analysis of major house-hold genes while the other technique relies on a global examination of the complete genome. Therefore, the epidemiological interpretation can be considered as relying on very solid genomic basis. Thus the AP-PCR, because being easily implemented and thanks to this “inter-validation” with

MLST results, could be a reliable tool for molecular epidemiological studies of both shrimp diseases caused by *V. nigripulchritudo* in New Caledonia.

Actually, this study gives very informative insights into the epidemiology of *V. nigripulchritudo* in New Caledonian shrimp culture. One cluster (B) groups all Syndrome 93 isolates, from one single geographical origin [14] together with strains from an opportunistic vibriosis outbreak that occurred in a farm from the same bay during the summer 2002–2003. This demonstrates that this cluster, though being originally involved in winter mortalities (Syndrome 93) can also possibly be involved in opportunistic outbreaks during summer months.

The major cluster (A) includes 20 wild-type isolates and puts together all Summer Syndrome isolates from diseased animals, from both affected farms, whatever their date of isolation, over more than 3 years covering 4 culture cycles. Together with these strains, a few environmental isolates from the affected farms (sediment pore water or pond water) demonstrate that they may be environmentally transmitted. This evidences that the Summer Syndrome is most probably attributable to a single pathogenic clone, surviving from one year to the next in the shrimp farm environment then re-developing inside the grow out system at the next crop. Also within this cluster, other isolates originate from opportunistic mortality outbreaks from other farms or hatcheries or from healthy juvenile shrimp from both Summer Syndrome-affected and non-affected farms all along the West coast of New Caledonia. This not only highlights the major role of environmental or

zootechnical factors in the dynamics of the Summer Syndrome in the affected farms but also demonstrates that this pathogenic *V. nigripulchritudo* cluster already has a wide geographical distribution. Therefore, it can be assumed that the emergence of Summer Syndrome does not correspond to the geographical extension of pathogenic *V. nigripulchritudo* strains associated with Syndrome 93, but merely corresponds to the selection of another pathogenic clone within a shrimp farm environment.

The selection of bacterial strains used in this study was composed of a single strain conserved for each individual shrimp, this isolate being considered representative of clonal *V. nigripulchritudo* being present in the shrimp hemolymph, except in one moribund shrimp (2 strains Wn13 and Wn14) and one healthy carrier shrimp (3 strains AgMn1, AgMn2 and AgMn3) [15]. So it was considered that one infected shrimp would carry *V. nigripulchritudo* cells from a single clonal origin. However, it was demonstrated that other marine invertebrates, namely oysters, could carry non-clonal (both human-pathogenic and non-pathogenic) *V. parahaemolyticus* cells at the same time [7]. Even though within the few strains originating from the same animals that we included in this study, there was no evidence of multi-clonal carriage of *V. nigripulchritudo* in shrimp, further work could consider verifying our assumption, notably study if shrimp can carry both virulent and non-virulent strains at the same time.

When comparing the molecular typing with experimental pathology results, it must be noted that some strains genetically close to the Syndrome 93 isolates (cluster B) demonstrated no experimental virulence towards *L. stylirostris*, whereas strains from the “Summer Syndrome” cluster (A) all demonstrated virulence. Still, even within this latter cluster, various levels of virulence could probably be evidenced [15] with more discriminative experimental infection models [32].

Still, *V. nigripulchritudo* from both Syndrome 93 and Summer Syndrome clusters could be isolated from opportunistic vibriosis episodes or even from apparently healthy shrimp in non-diseased farms. This demonstrates that the disease is the result of complex interactions between the pathogen, the shrimp (host) and their environment. As a response, IFREMER (the French Institute for Marine Sciences) has developed a specific research program, named DeSanS (possibly translated as *Stylirostris* Health Challenge), that is based on a multi-disciplinary approach (rearing technology, pond ecosystem studies, shrimp eco-physiology and immunology, nutrition, pathology and genetics). It aims at gaining a global explanation scheme of both seasonal vibriosis as a contribution to strengthen the sustainability of New Caledonian aquaculture [17]. Summer syndrome being currently a research priority within DeSanS, a representative strain of this disease was

chosen in order to study virulence determinants, pathogenesis and host damages. Comparatively with a non-virulent isolate, these strains are being studied for their production of extracellular toxic products, infection capacity and shrimp response. Lastly, a genomic subtraction using Suppressive Subtractive Hybridization is currently in progress.

## Acknowledgments

This work was partly supported by grants from the South and North Provinces of New Caledonia, Ifremer and the French Ministry of Research. Thanks are due to J. Herlin, A.-L. Marteau and B. Wapoto for participating to the isolation of some *V. nigripulchritudo* strains from 1999 on and to the Territorial Laboratory of Veterinary Diagnosis of New Caledonia for maintaining and supplying the 1995 isolates. The authors are indebted to B. Austin for giving a critical advice and valuable corrections to the manuscript.

## References

- [1] B. Austin, M. Alsina, D.A. Austin, A.R. Blanch, F. Grimont, P.A.D. Grimont, J. Joffre, S. Koblavi, J.L. Larsen, K. Pedersen, T. Tiainen, L. Verdonck, J. Swings, Identification and typing of *Vibrio anguillarum*: a comparison of different methods, *Syst. Appl. Microbiol.* 18 (1995) 285–302.
- [2] P. Bidet, V. Lalande, B. Salauze, B. Burghoffer, V. Avesani, M. Delmée, A. Rossier, F. Barbut, J.C. Petit, Comparison of PCR-ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*, *J. Clin. Microbiol.* 38 (2000) 2484–2487.
- [3] J.A. Brock, B. LeaMaster, A look at the principal bacterial, fungal and parasitic diseases of farmed shrimp, In: J. Wyban (Ed.), *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 1992, pp. 212–226.
- [4] E. Chachaty, P. Saulnier, A. Martin, N. Mario, A. Andrement, Comparison of ribotyping, pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA for typing *Clostridium difficile* strains, *FEMS Microbiol. Lett.* 122 (1994) 61–68.
- [5] M.C. Collier, F. Stock, P.C. DeGirolami, M.H. Samore, C.P. Cartwright, Comparison of PCR-based approaches to molecular epidemiologic analysis of *Clostridium difficile*, *J. Clin. Microbiol.* 34 (1996) 1153–1157.
- [6] R. Costa, I. Mermoud, S. Koblavi, B. Morlet, P. Haffner, F. Berthe, M. Le Groumellec, P. Grimont, Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia, *Aquaculture* 164 (1998) 297–309.
- [7] A. DePaola, J.L. Nordstrom, J.C. Bowers, J.G. Wells, D.W. Cook, Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 1521–1526.

- [8] D.L. Ellsworth, K.D. Rittenhouse, R.L. Honeycutt, Artfactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns, *BioTechniques* 14 (1993) 214–217.
- [9] N. Galtier, M. Gouy, C. Gautier, Seaview and Phylo\_win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny, *Comput. Appl. Biosci.* 12 (1996) 543–548.
- [10] O. Gascuel, BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data, *Mol. Biol. Evol.* 14 (1987) 685–695.
- [11] C. Goarant, J. Herlin, D. Ansquer, F. Imbert, D. Domalain, A.L. Marteau, Épidémiologie de *Vibrio nigripulchritudo* dans le cadre du Syndrome d'été: résultats préliminaires du programme DESANS, In: C. Goarant, A. Herbland, Y. Harache, C. Mugnier (Eds.), *Styli 2003, Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie*, vol. 38, Ifremer Éd., Actes Colloq., 2004, pp. 210–215 (in French with English abstract).
- [12] C. Goarant, J. Herlin, D. Ansquer, R. Brizard, A.L. Marteau, *Vibrio penaeicida* and Syndrome 93 in New Caledonian prawn farming: review and perspectives, In: C. Goarant, A. Herbland, Y. Harache, C. Mugnier (Eds.), *Styli 2003, Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie*, vol. 38, Ifremer Éd., Actes Colloq., 2004, pp. 203–209 (in French with English abstract).
- [13] C. Goarant, J. Herlin, R. Brizard, A.L. Marteau, C. Martin, B. Martin, Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp, *Dis. Aquat. Org.* 40 (2000) 101–107.
- [14] C. Goarant, F. Mérien, F. Berthe, I. Mermoud, P. Pérolat, Arbitrarily primed PCR to type *Vibrio* spp. pathogenic for shrimp, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 1145–1151.
- [15] C. Goarant, D. Ansquer, J. Herlin, D. Domalain, F. Imbert, S. De Decker, “Summer Syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture*, in press, published online 24 August 2005.
- [16] T.A. Hall, BioitEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41 (1999) 95–98.
- [17] Y. Harache, A. Herbland, Le programme DESANS (Défi Santé *Stylirostris*): une démarche comparable au Défi MOREST appliquée à la filière crevette Calédonienne, In: C. Goarant, A. Herbland, Y. Harache, C. Mugnier (Eds.), *Styli 2003, Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie*, vol. 38, Ifremer Éd., Actes Colloq., 2004, pp. 31–38 (in French with English abstract).
- [18] D.P. Jackson, J.D. Hayden, P. Quirke, Extraction of nucleic acid from fresh and archival material, In: M.J. McPherson, P. Quirke, G.R. Taylor (Eds.), *PCR: a Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, 1991, pp. 29–49.
- [19] N. Kautsky, P. Ronnback, M. Tedengren, M. Troell, Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming, *Aquaculture* 191 (2000) 145–161.
- [20] F. Le Roux, A. Goubet, F.L. Thompson, N. Fauray, M. Gay, J. Swings, D. Saulnier, *Vibrio gigantis* sp. nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*), *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 55 (2005) 2251–2255.
- [21] D.V. Lightner, *Vibrio* disease of penaeid shrimp, In: C.J. Sindermann, D.V. Lightner (Eds.), *Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture*, Elsevier, Amsterdam, 1998, pp. 42–47.
- [22] D.V. Lightner, D.H. Lewis, A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp, *Mar. Fish. Rev.* 37 (1975) 25–28.
- [23] D.V. Lightner, R.M. Redman, Shrimp diseases and current diagnostic methods, *Aquaculture* 164 (1998) 201–220.
- [24] M.C. Maiden, J.A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J.E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D.A. Caugant, I.M. Feavers, M. Achtman, B.G. Spratt, Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 3140–3145.
- [25] I. Mermoud, R. Costa, O. Ferré, C. Goarant, P. Haffner, Syndrome 93 in New Caledonian outdoor rearing ponds of *Penaeus stylirostris*: history and description of the three major outbreaks, *Aquaculture* 164 (1998) 323–335.
- [26] L.L. Mohny, D.V. Lightner, An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond-reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda), *J. World Aquacult. Soc.* 25 (1994) 116–125.
- [27] M. Nei, Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals, *Genetics* 89 (1978) 583–590.
- [28] Y.A. O'Shea, F.J. Reen, A.M. Quirke, E.F. Boyd, Evolutionary genetic analysis of the emergence of epidemic *Vibrio cholerae* isolates on the basis of comparative nucleotide sequence analysis and multilocus virulence gene profiles, *J. Clin. Microbiol.* 42 (2004) 4657–4671.
- [29] P. Perolat, F. Merien, W.A. Ellis, G. Baranton, Characterization of *Leptospira* isolates from serovar hardjo by ribotyping, arbitrarily primed PCR, and mapped restriction site polymorphisms, *J. Clin. Microbiol.* 32 (1994) 1949–1957.
- [30] B. Rosenberry, World shrimp farming 2004, *Shrimp News International*, San Diego, CA, 2004.
- [31] D. Saulnier, J.C. Avarre, G. Le Moullac, D. Ansquer, P. Levy, V. Vonau, Rapid and sensitive PCR detection of *Vibrio penaeicida*, the putative etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonia, *Dis. Aquat. Org.* 40 (2000) 109–115.
- [32] D. Saulnier, P. Haffner, C. Goarant, P. Levy, D. Ansquer, Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review, *Aquaculture* 191 (2000) 133–144.
- [33] A.M. Schuur, Evaluation of biosecurity applications for intensive shrimp farming, *Aquacult. Eng.* 28 (2003) 3–20.
- [34] V.J. Smith, J.H. Brown, C. Hauton, Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?, *Fish Shellfish Immunol.* 15 (2003) 71–90.
- [35] E. Stackebrandt, T.M. Embley, Diversity of uncultured microorganisms in the environment, In: R.R. Cowell,

- D.J. Grimes (Eds.), *Nonculturable Microorganisms in the Environments*, ASM, Washington, DC, 2000, pp. 55–57.
- [36] Y. Takahashi, Y. Shimomaya, K. Momomaya, Pathogenicity and characteristics of *Vibrio* sp. isolated from cultured kuruma prawns *Penaeus japonicus* Bate, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 51 (1985) 721–730.
- [37] C.C. Thompson, F.L. Thompson, K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, P. Dawyndt, J. Swings, Use of *recA* as alternative phylogenetic marker in the family *Vibrionaceae*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 (2004) 919–924.
- [38] M.C.L. Vickery, A.L. Smith, A. DePaola, D.D. Jones, R.J. Steffan, A.K. Bej, Optimization of the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) for intra-species differentiation of *Vibrio vulnificus*, *J. Microbiol. Methods* 33 (1998) 181–189.
- [39] J. Welsh, M. McClelland, Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, *Nucl. Acids Res.* 18 (1990) 7213–7218.
- [40] M. Weppe, J.R. Bonami, D.V. Lightner, AQUACOP, Demostración de la altas cualidades de la cepa de *P. stylirostris* (AQUACOP SPR 43) resistente al virus IHHN, In: Escuela Superior Politécnica del Litoral (Eds.), *Memorias I Congreso Ecuatoriano de acuicultura*, Guayaquil, 1993, pp. 229–232 (in Spanish).
- [41] F.C. Yeh, T.J.B. Boyle, Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits, *Belg. J. Bot.* 129 (1997) 157.



## Annexe II - Article 2

Publié dans Journal of Microbiological Methods en 2007

### **“Sequence polymorphism-based identification and quantification of *Vibrio nigripulchritudo* at the species and subspecies level targeting an emerging pathogen for cultured shrimp in New Caledonia.”**

La compréhension de la pathogénèse nécessite non seulement l'identification mais également la quantification de l'agent étiologique de la maladie étudiée, dans l'hôte et dans le milieu extérieur. En ce qui concerne *V. nigripulchritudo*, des souches HP type Syndrome d'été ont été identifiées dans l'eau de bassins et au niveau du sédiment des fermes. L'identification et la quantification de ces souches devaient nécessairement passer par un typage moléculaire (techniques présentées dans le chapitre I) et une quantification sur boîte de gélose nutritive. Cette démarche reste lourde en termes de temps et de moyens. D'autre part, la phase de culture nécessaire à l'isolement peut se heurter à la mauvaise cultivabilité des bactéries présentes, comme dans le cas des états viables non cultivables. La phylogénie mise en évidence par l'étude en MLST ayant de bonnes corrélations avec les connaissances épidémiologiques et de virulence, il a été envisagé d'utiliser ces polymorphismes de séquences pour développer un outil diagnostique du groupe A. Cette approche présentée dans l'article 2 qui suit a été développée en collaboration entre l'équipe pathologie de l'IFREMER et l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie : il s'agit d'une PCR en temps réel, sur la base de la séquence du gène *gyrB* (gène le plus polymorphe en MLST et dont la séquence est suffisamment informative pour caractériser la position phylogénique de notre sélection de souches), ciblant spécifiquement les souches de *V. nigripulchritudo* appartenant au groupe phylogénétique A. Les séquences des gènes *toxR*, *recA* et *rciB* permettaient également une bonne discrimination du groupe A, mais certaines particularités de séquence de *gyrB* rendaient le design plus facile sur ce gène.

Cet outil permet une quantification dans les hémolymphes et le milieu d'élevage des *V. nigripulchritudo* du groupe A. Sa limite réside dans le fait qu'il ne permet toujours pas la distinction entre les deux pathotypes HP et MP, identifiés au sein du groupe A. Toutefois, il faut noter que des souches MP du groupe A sont très rarement isolées des fermes affectées par le Syndrome d'été. Par la suite, la même approche pourra être développée mais sur la base de gènes marqueurs des souches HP type Syndrome d'été.

# Sequence polymorphism-based identification and quantification of *Vibrio nigripulchritudo* at the species and subspecies level targeting an emerging pathogen for cultured shrimp in New Caledonia

Cyrille Goarant<sup>a,b,\*</sup>, Yann Reynaud<sup>b,c</sup>, Dominique Ansquer<sup>b</sup>, Sophie de Decker<sup>b</sup>, Fabrice Merien<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Recherche en Bactériologie, Institut Pasteur de Nouvelle Calédonie, Noumea, New Caledonia

<sup>b</sup> IFREMER, Département Aquaculture en Nouvelle-Calédonie, Noumea, New Caledonia

<sup>c</sup> IFREMER, Département Génétique et Pathologie, La Tremblade, France

Received 17 January 2007; received in revised form 16 March 2007; accepted 20 March 2007

Available online 30 March 2007

## Abstract

In a previous study, we demonstrated the existence of an emerging cluster of *Vibrio nigripulchritudo* that proved to be associated with shrimp mortality events in New Caledonia. Using sequence polymorphisms evidenced in this previous MultiLocus Sequence Typing study, we developed two new quantitative PCR assays permitting the detection and quantification of *V. nigripulchritudo* at the genospecies level using SYBR Green I chemistry and at the emerging cluster level using Fluorescence Resonance Energy Transfer technology with hybridization probes.

The use of this molecular diagnostic tool evidenced the colonization of the shrimp pond ecosystem by the pathogenic cluster at least at the onset of the disease. This new tool will allow better investigation of the dynamics of this bacterial pathogen in the shrimp farm ecosystem.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Real-time PCR; Mariculture; Pathogen; *Vibrio*; Cluster-specific; Shrimp

## 1. Introduction

*Vibrio* species are widely distributed bacteria that colonize aquatic habitats, and are notably present in and around mariculture facilities. Vibriosis, diseases caused by *Vibrio* species, are known to be major disease problems in farmed marine animals, including penaeid shrimp, in which they have been recognized as potential pathogens since the beginning of shrimp farming activities (Lightner and Lewis, 1975; Bondad-Reantaso et al., 2005). However, diagnostic tools allowing to study vibriosis in shrimp have seldom been developed. Conventional laboratory methods based on bacterial culture and isolation from the shrimp or its environment demand the use of suitable culture media and subsequent identification. Moreover, they are time-consuming and require several days to obtain confirmatory results. Additionally, the concept of “infective dose” is of parti-

cular concern in *Vibrio* infections (Lobitz et al., 2000), and was notably confirmed in shrimp vibriosis (Saulnier et al., 2000). Therefore, the development of reliable, quantitative and sensitive methods for the detection of bacterial shrimp pathogens is essential both for research studies or to conceive and control sanitization practices.

Conventional polymerase chain reaction (PCR) method had the potential to make a dramatic impact in diagnosing infectious diseases. More recently, the use of real-time PCR has made the detection and quantification of bacteria much more rapid and was successfully applied to a number of *Vibrio* species (Blackstone et al., 2003; Panicker et al., 2004) including shrimp pathogens (Goarant and Mérien, 2006).

Additionally, it is recognized that strains belonging to the same *Vibrio* species can have different virulence patterns to shrimp (Oakey and Owens, 2000; Hernandez and Olmos, 2004; Goarant et al., 2006a). However the knowledge of the pathophysiology of vibriosis in shrimp remains limited and little is known concerning virulence factors in *Vibrio* that are pathogenic to shrimp. As a consequence, there is frequently a lack of genomic data that would

\* Corresponding author. Laboratoire de Recherche en Bactériologie, Institut Pasteur of New Caledonia, BP 61, 98845 Noumea cedex, New Caledonia.

E-mail address: [cgoarant@ifremer.fr](mailto:cgoarant@ifremer.fr) (C. Goarant).

enable the development of relevant molecular tools able to discriminate between different genotypes within a *Vibrio* species. Very few of these have recently been developed in the field of shrimp pathology but still require culture and isolation of the targeted organism (Hernandez and Olmos, 2004).

In recent years, there is increased access to high throughput sequencing throughout the world and MultiLocus Sequence Typing (MLST) is becoming a standard for epidemiological studies (Feil and Enright, 2004; Cooper and Feil, 2004; Hall and Barlow, 2006). As a result, there is increased opportunity to gain access to epidemiologically relevant sequencing data providing the basis for the design of relevant diagnostic tools. For instance, cluster-specific sequencing data were successfully used to design a PCR assay targeting a regional variant of *Vibrio* spp. associated with shrimp disease (Rañoa and Hedreyda, 2005).

New Caledonia is located in the South Pacific between latitudes 19°S and 23°S and has a tropical oceanic climate. Its shrimp industry is a small but growing industry that benefits from an almost virus-free status. However, New Caledonian shrimp farming has been affected since 1993 by a cool season vibriosis named Syndrome 93 and causing high mortalities in juvenile shrimp (Mermoud et al., 1998). This disease was shown to be caused by *Vibrio penaeicida* but also implicated a few other *Vibrio* strains including *V. nigripulchritudo* (Costa et al., 1998). These pathogenic *V. nigripulchritudo* strains were geographically restricted to two adjoining farms within one bay (Goarant et al., 1999). However *V. nigripulchritudo* was later isolated in December 1997 from an outbreak of a new disease in one farm located 50 km south of the original isolation. First diagnosed in one farm, the organism was also causing a systemic vibriosis, but in high temperature conditions that did not fit the classical Syndrome 93 epidemiology, which typically occurs at low water temperatures. This new disease, named “Summer Syndrome” has affected all summer crops on this farm ever since and since 2002, affected a new farm built close to the affected one (Goarant et al., 2006a). Currently, another neighbouring farm is also suspecting the onset of this disease. Experimental infections together with a molecular typing study revealed that both pathogenic and non-pathogenic *V. nigripulchritudo* strains co-existed in a single shrimp farm environment and that the disease, named “Summer Syndrome” was caused by a single, possibly emerging cluster of virulent strains (Goarant et al., 2006a,b). The facts that (i) *V. nigripulchritudo* is associated with two distinct shrimp diseases and (ii) that one of these (“Summer Syndrome”) is possibly emergent highlight the need for a relevant diagnostic tool targeting the emerging cluster of pathogenic strains.

Emerging infectious diseases in marine ecosystems are recognized to be on the rise, though it is also recognized that little progress has been made in identifying the causative agents (Harvell et al., 1999). Regarding this issue, PCR and more recently real-time PCR assays have allowed highly specific tools that have proven very powerful.

Here we describe the development and optimization of a real-time PCR assay using SYBR Green I chemistry for the rapid identification and quantification of *V. nigripulchritudo* at the genospecies level and using the FRET technology with the hybridization probe (HybProbe®) format (see Espy et al., 2006

for review) for specific distinction and quantification of strains from this emerging pathogenic cluster, both on the LightCycler platform.

## 2. Material and methods

### 2.1. Bacterial strains and DNAs

Both the type strain and wild-type isolates of *V. nigripulchritudo* were used in this study. *V. nigripulchritudo* CIP 103192<sup>T</sup> (ATCC 27043) was provided by Collection de l’Institut Pasteur, Paris, France. Twenty three wild-type isolates, from both clinical and environmental origins, isolated between May 1995 and October 2003 in different farms and hatcheries of the New Caledonian West Coast were included in this study (Table 1). The origin, identification and virulence of these *V. nigripulchritudo* isolates towards healthy *Litopenaeus stylirostris* were reported previously (Goarant et al., 2006a) (see Table 1). All 23 strains are deposited in the bacterial collection of the CRB (Centre de Ressources Biologiques, Laboratoire de Génétique et Pathologie, Institut Français de Recherche pour l’Exploitation de la MER (IFREMER), La Tremblade, France).

To assess the specificity of our real-time assays, we used a panel of strains from other *Vibrio* species (*V. penaeicida* KH-1<sup>T</sup> from Japan, *V. penaeicida* AM101 from New Caledonia, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. nigripulchritudo*, *V. aesturianus*, *V. tubiashii*, *V. damsela*, *V. orientalis*, *V. splendidus*, *V. fluvialis* and *V. nereis*). Bacterial strains other than members of the genus *Vibrio* (*Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Acinetobacter baumannii*, *Shigella flexneri*, and *Salmonella* spp.) were also used for specificity tests. All strains were subcultured in adequate media and their respective genomic DNA were extracted and purified as described by Brenner et al. (1999).

### 2.2. Sequence data, primers and probe design

The sequences of six genes (*rrs*, *toxR*, *gyrB*, *rpoD*, *rctB* and *recA*) were determined previously as part of a molecular typing study for all *V. nigripulchritudo* strains (Goarant et al., 2006b). *V. nigripulchritudo* sequences from all six genes were aligned with BioEdit® (Hall, 1999) using CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) and phylogenetic trees were built using Phylo-win program (Galtier et al., 1996) applied to Neighbour Joining method and Kimura’s 2-parameter distances (Gascuel, 1987). Reliability of topologies was assessed by the bootstrap method with 1000 replicates.

Twenty eight *Vibrio* spp. *gyrB* sequences retrieved from GenBank were aligned together with 24 *V. nigripulchritudo* sequences (Goarant et al., 2006b) using BioEdit® (Hall, 1999). Primers specific for *V. nigripulchritudo* (genospecies) and probes specific for the emerging cluster were deduced from this alignment. Primers VngF2 (CCCGAACGAAGCGAAA) and VngR2 (ACCTTTCAGTGGCAAGATG) and probes specific of the emerging cluster VngA1 (TGTGGAGGGT-GACTCTGC-Fluorescein) and VngS1 (Red705-CCCAGCA-CTCTCTGAACTCTAT-Phosphate) were designed using the

Table 1  
*Vibrio nigripulchritudo* strains

Strain name	Date of isolation	Context	Virulence to <i>L. stylirostris</i>
CIP 103195 <sup>T</sup>		<i>V. nigripulchritudo</i> type strain, oceanic waters	N
AM102	May 1995	Syndrome 93, moribund shrimp hemoculture	V
AM 115	May 1995	Syndrome 93, moribund shrimp hemoculture	V
SO65	May 1995	Syndrome 93, moribund shrimp hemoculture	V
<b>SFn1</b>	March 2000	Summer Syndrome, moribund shrimp hemoculture	V
<b>SFn27</b>	December 2000	Sediment pore water, diseased pond	V
<b>SFn115</b>	March 2002	Lagoon water in front of pumps, diseased farm	N
<b>SFn118</b>	April 2002	Lagoon water in front of pumps, diseased farm	N
<b>SFn135</b>	December 2002	Growout pond water, diseased pond	V
<b>AgMn1</b>	October 2003	Healthy shrimp hemoculture, before disease outbreak	N
<i>POn3</i>	April 2002	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond 3, healthy farm	V
<i>POn4</i>	April 2002	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond 6, healthy farm	N
<i>POn12</i>	December 2002	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond 4, healthy farm	N
<i>POn13</i>	December 2002	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond 4, healthy farm	N
<i>POn19</i>	January 2003	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond 4, healthy farm	V
AMn3	March 2003	Moribund shrimp hemoculture, opportunistic vibriosis	V
Wn1	January 2001	Moribund shrimp hemoculture, opportunistic vibriosis	V
Wn3	January 2001	Moribund shrimp hemoculture, opportunistic vibriosis	V
Wn13	November 2002	Moribund shrimp hemoculture, opportunistic vibriosis	V
<i>Fn2</i>	February 2003	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond, healthy farm	N
<i>AQn1</i>	March 2003	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond, healthy farm	V
BLFn1	March 2001	Moribund shrimp hemoculture, opportunistic vibriosis	V
<i>ENn2</i>	June 2000	Healthy shrimp hemoculture, healthy broodstock	V
<i>SVn3</i>	February 2003	Healthy shrimp hemoculture, healthy farm	N

**Bold:** Isolates from farms which are affected by the Summer Syndrome.

*Italics:* Isolates collected during surveys specifically dedicated to the isolation of *V. nigripulchritudo* strains.

Virulence: V stands for virulent and N for non-virulent (data from Goarant et al., 2006a).

Letters in strain names spells for the isolation farms, i.e. same letters indicate same farm.

LightCycler Probe Design software 2.0 (Roche Applied Science) and synthesized by Prologo Singapore Pty Ltd (Biopolis way, Singapore). All primers and probes sequences were checked online against the NCBI genomic database GenBank to verify their specificity for their intended target.

### 2.3. Real-time PCR reactions and optimization

The LightCycler FastStart DNA Master PLUS SYBR Green I kit (Roche Applied Science, Auckland, New Zealand) was used as the basis for the reaction mixtures, using a 20  $\mu$ l volume in each reaction capillary. Primers VngF2 and VngR2 were used at 0.5  $\mu$ M and the reaction optimized for specificity. The LightCycler FastStart DNA Master PLUS Hybridisation Probe kit (Roche Applied Science) was used with the hybridization probes VngA1 and VngS1 in conjunction with the VngF2 and VngR2 primers and the reaction optimized for optimal signal to noise ratio by testing 0.1, 0.2 and 0.4  $\mu$ M each probe. After distributing 15  $\mu$ l aliquots of the master mix among the capillaries, 5  $\mu$ l of a DNA extract was added before the capillaries were capped, centrifuged and placed in the LightCycler 2.0 sample carousel. A negative control with PCR-grade water rather than template DNA was always used with the samples. Aerosol-barrier pipette tips were used throughout the procedure. The PCR conditions were optimized by testing various annealing temperatures (from 57 to 63  $^{\circ}$ C) and durations (from 2 to 5 s) and elongation duration (10, 12 or 15 s). Amplification conditions involved a pre-incubation at 95  $^{\circ}$ C for 10 min (FastStart *Taq* DNA polymerase activation) followed by

amplification of the target DNA for 45 (50 for the probe-based assay) cycles of 95  $^{\circ}$ C for 5 s, 62  $^{\circ}$ C or 60  $^{\circ}$ C for 3 s (for SYBR Green I assay or hybridization probe assay respectively) and 72  $^{\circ}$ C for 12 s using a transition rate of 20  $^{\circ}$ C/s between all steps. Melting curve analysis was performed subsequently at a linear temperature transition rate of 0.1  $^{\circ}$ C/s from 65  $^{\circ}$ C to 95  $^{\circ}$ C with continuous fluorescence acquisition. This step was followed by a cooling step at 40  $^{\circ}$ C for 30 s. The first derivative of the initial melting curve ( $-dF/dT$ ) was automatically plotted against temperature for improved determination of the melting temperature ( $T_m$ ). All experiments were repeated at least twice for reproducibility.

### 2.4. Standard curves

The amplified 258 bp product was loaded on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide and electrophoresed for 40 min at 15 V  $\text{cm}^{-1}$ . The amplicon was then sliced from the gel under UV illumination and purified using the MinElute Gel Extraction kit (Qiagen, Doncaster, Victoria, Australia). The copy number of this extract was determined by spectrophotometer (Eppendorf BioPhotometer) and conversion based on amplicon size (Overbergh et al., 2003). Serial dilutions of the amplicon from 7.2 to  $7.2 \times 10^8$  gene copies per reaction were then amplified in triplicates in order to obtain the standard curves. One standard curve was then calculated for each assay (SYBR Green I and Hybridization Probes) using LightCycler Software 4.0 (Roche Applied Science) and validated according to established parameters.

### 2.5. Validation with field samples

In order to validate these assays, samples were taken from a pond in a farm affected by the Summer Syndrome. The inlet channel, the growout pond (pond water and sediment pore water at two different locations in the pond) and the outlet channel were sampled weekly for 5 weeks resulting in 25 environmental field samples and processed as described previously (Goarant and Mérien, 2006) from one week before a mortality outbreak. Moribund shrimp specimens were used to confirm the etiological agent of this mortality outbreak. The mortality data, kindly provided by the farm's staff, is presented as the total daily number of dead and moribund shrimp found on the pond edges.

## 3. Results

### 3.1. Choice of target gene, primers and probes design

Out of the six genes studied, five permitted to clearly discriminate the emerging cluster from other *V. nigripulchritudo* strains. Of these, *gyrB* was considered the best target choice according to its discriminating potential, as shown on the dendrogram in Fig. 1. Additionally, the corresponding nucleotide sequence displayed 3 point mutations within a 16 bp region where a cluster-specific probe pair could be designed. The sensor probe was designed to overlap these mutations, the Anchor probe being designed over a conserved flanking region (Fig. 2). Forward and reverse primers were chosen within regions being conserved in all *V. nigripulchritudo* but variable over the genus *Vibrio*. Over the possible primers, only the ones displaying at least two mismatches for the other *Vibrio* species were considered.

### 3.2. Specificity

The specificity of both assays (using SYBR Green I or hybridization probe format) was assessed using DNAs from a selection of *V. nigripulchritudo* (see Table 1) and a variety of *Vibrio* spp. and non-*Vibrio* isolates, as listed in the Material and methods Section. All *V. nigripulchritudo* strains yielded the single expected 258 bp amplicon, confirmed by agarose gel electrophoresis. None of the non-*V. nigripulchritudo* strains gave any detectable amplicon when the run was as follows: 45 cycles of 95 °C for 5 s, 62 °C for 3 s and 72 °C for 12 s, which was determined to be the optimal condition for SYBR Green I quantification at the species level. When using hybridization probes, only the strains belonging to the emerging pathogenic cluster of *V. nigripulchritudo* produced fluorescence by FRET technology when the run was as follow: 50 cycles including 95 °C for 5 s, 60 °C for 3 s and 72 °C for 12 s, whereas the expected 258 bp amplicon could be detected on agarose gel for all *V. nigripulchritudo* strains, but not detected by the hybridization probe format, because of sequence polymorphism preventing the hybridization of the sensor VngS1 probe.

### 3.3. Genotypes and melting temperatures

The melting curves were obtained by denaturing the amplicon at the end of the amplification step after a SYBR Green I run. Melting temperatures of the amplicons obtained from the emerging cluster were in the range [87.5–87.8] °C, from the type strain 88.2 °C, and all other *V. nigripulchritudo* isolates in the range [88.4–89.1]°C. Unfortunately, the proximity of the type strain's  $T_m$  did not permit to distinguish with certainty this strain from the emerging cluster. However, this should permit excluding the emerging genotype when  $T_m$  is over 88.3 °C (+0.5 °C) when

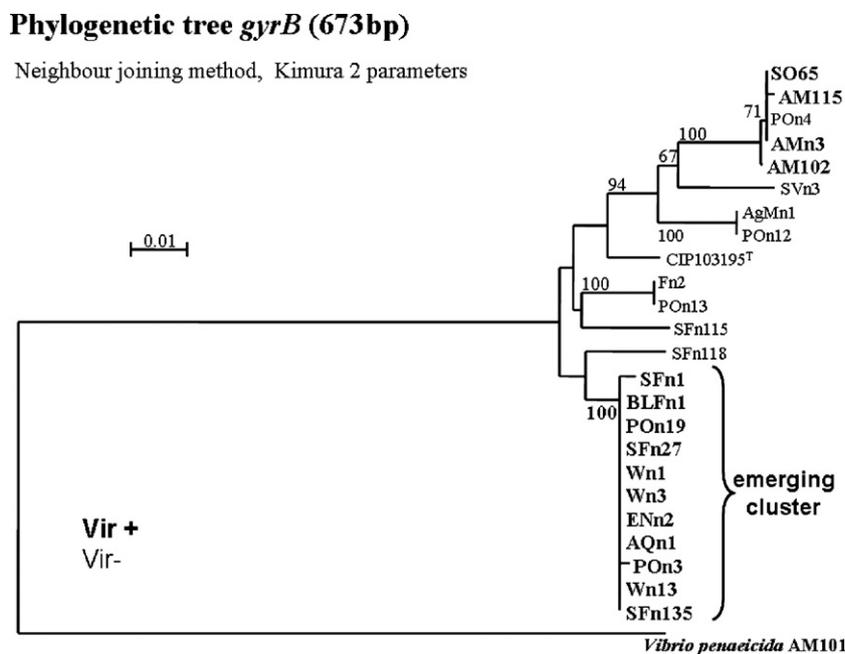


Fig. 1. Dendrogram drawn from *gyrB* sequences alignment over a selection of *V. nigripulchritudo* strains evidence of the emerging cluster of pathogenic strains.



using this SYBR Green I PCR assay with clonal samples, e.g. purified DNA from an unknown strain (Fig. 3B).

When amplifying mixed populations of both the emerging cluster and other strains (so as to reflect the diversity possibly seen in environmental samples), the  $T_m$  shift between the emerging cluster's and the other strains was not sufficient to enable the distinction of a 2-peak shape of the melting peak curve (Fig. 3C).

### 3.4. Standard curves and quantification in environmental samples

The standard curves obtained using the SYBR Green I and the hybridization probe assays are shown in Fig. 4. The detection limit was estimated using standard LightCycler

software parameters to be of 20 gene copies per capillary for the SYBR Green I assay (after 45 cycles) and 5 gene copies per capillary for the hybridization probe format (50 cycles).

Moribund shrimp samples from the affected farm confirmed that the observed mortality was actually caused by the typical Summer Syndrome and that a highly pathogenic *V. nigripulchritudo* from the emerging cluster was the etiological agent involved as previously described (Goarant et al., 2006a). Using environmental samples taken from this affected pond, *V. nigripulchritudo* belonging to the emerging cluster could be evidenced from the sediment pore waters and pond water during and after the mortality outbreak. Using the SYBR Green I assay, the species *V. nigripulchritudo* could be detected from the water and the sediment pore water but seldom from the outlet channel. The same samples studied with the hybridization probe assay demonstrated that the emerging cluster could be found in these samples from the onset of the disease. *V. nigripulchritudo* from the emerging cluster were found in pond water ( $4 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ ) and the sediment pore water at two locations in the pond ( $400 \text{ ml}^{-1}$  in one point and  $1100 \text{ ml}^{-1}$  in the other point) on the day the first moribund shrimp was observed and until the last but one sample, corresponding to the end of the mortality outbreak (Fig. 5). Interestingly, it was detected only once and at a relatively low concentration from the outlet channel ( $250 \text{ ml}^{-1}$ ). The last samples, taken one week after the end of this outbreak, tested all negative. During this 5-week survey, all samples from the pumping (renewal) water tested negative with either assay.

## 4. Discussion

Vibriosis has been a major problem in shrimp farming since the beginning of this activity. However, diagnostic tools have only recently been developed (Hernandez and Olmos, 2004; Rañoa and Hedreyda, 2005) because researchers have often lacked the necessary knowledge to design relevant infra-specific molecular tools.

Increased access to high throughput sequencing platforms has made MLST a typing reference technique for epidemiology in the recent years (Enright and Spratt, 1999; Urwin and Maiden, 2003; Cooper and Feil, 2004; Hall and Barlow, 2006) and has also been used in *Vibrio* (Kotetishvili et al., 2003; O'Shea et al., 2004; Goarant et al., 2006b; Lee et al., 2006). As a result, there is increased knowledge on group-specific sequences variations linked to epidemiologically significant data, providing a way to gain access to infra-specific molecular tools to study these complex pathologies.

Hybridization probes using FRET technology provide a tool to study sequence polymorphisms within an amplicon (see Espy et al., 2006 for review). A single nucleotide mismatch in the target of a sensor probe will result in a variation of annealing strength between the amplicon and the corresponding probe, resulting in a lower melting temperature of the probe system. More than two or three mismatches will abolish the FRET by preventing probe binding using an adequate annealing temperature. This technology is of particular interest and has often

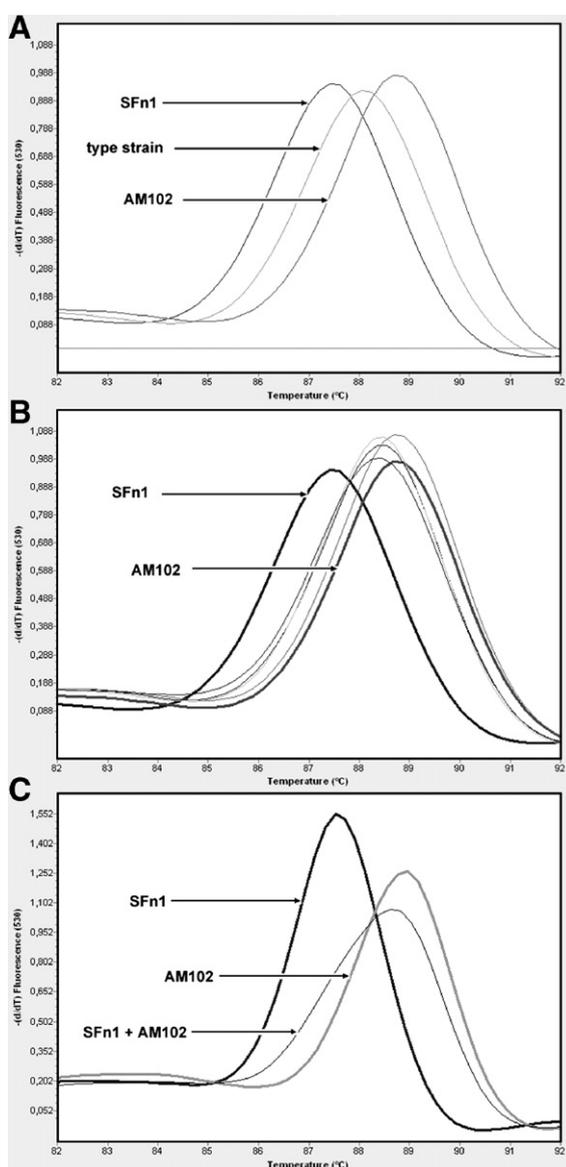


Fig. 3. Melting peaks of *V. nigripulchritudo* SFn1 (emerging cluster), AM102 (Syndrome 93) (bold lines) together with type strain (A) non-virulent strains from various origins AgMn1, Fn2, POn4, SFn115 (B) equal quantities of SFn1 and AM102 DNAs mixed as template (C).

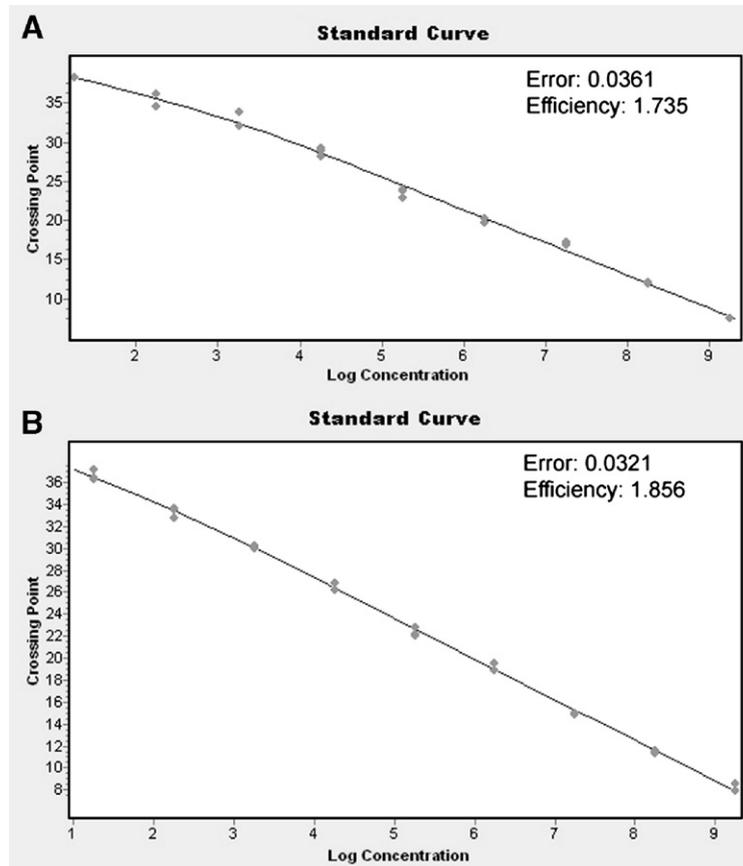


Fig. 4. Standard curves obtained with the SYBR Green I assay (A) and the hybridization probe format (B).

been used for intra-specific discrimination in both bacteria and viruses (Whalley et al., 2001; Hiratsuka et al., 2002; Vernel-Pauillac et al., 2006).

Since 1997 shrimp aquaculture in New Caledonia has been affected by a seasonal vibriosis inducing heavy mortality in two neighbouring farms. Experimental pathology and molecular

epidemiology studies demonstrated that this new disease is caused by a single emerging cluster of virulent strains (Goarant et al., 2006b). Using sequences derived from an MLST approach, we show that this cluster could be characterized by 3 point mutations on the *gyrB* gene, close enough to be covered by a single probe. These mutations appear stable enough to be

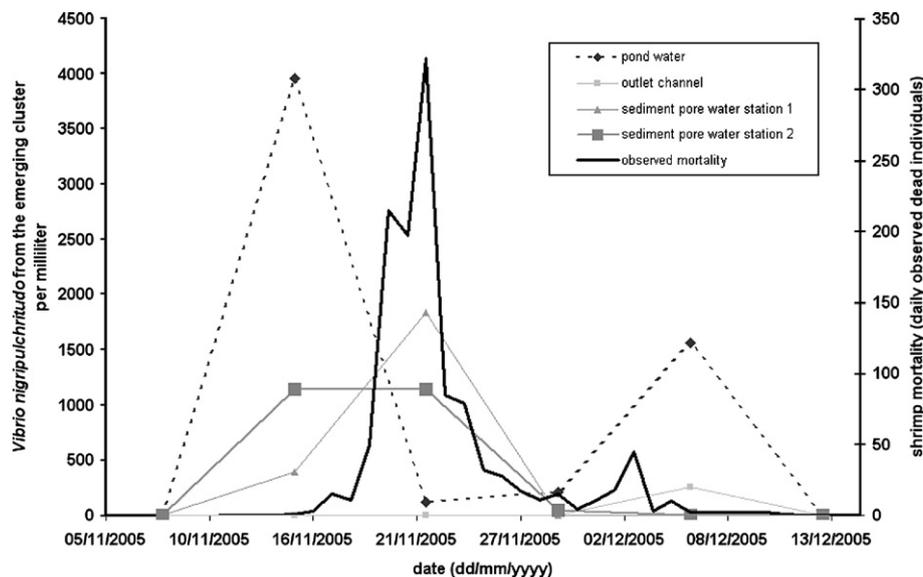


Fig. 5. Detection of *V. nigripulchritudo* from the emerging cluster and Summer Syndrome mortality during the survey of an affected pond.

used as a basis of our diagnostic tool, being conserved over our strain selection that covers 6 farms and more than 3 years (see Table 1). Using these mutations, we successfully developed a quantitative PCR assay on the LightCycler platform targeting this emerging shrimp pathogenic cluster within the genospecies *V. nigripulchritudo*. Using a species-specific primer set and adequate stringency, this assay allows the quantification of *V. nigripulchritudo* at the species level using SYBR Green I chemistry. Using a pair of hybridization probes targeting cluster-specific mutations and other optimized stringency conditions, this assay permits the detection and quantification of a particular cluster at the sub-species level.

The gene *gyrB* being single-copied in *Vibrio* genomes, absolute quantification corresponds to bacterial quantification. Therefore, we constructed our standard curve based on gene copies derived from spectrophotometric readings of a PCR product and calculation of copy numbers (Overbergh et al., 2003). It must be noted that the exact yield of the extraction process from samples must be lower than 1 and therefore the concentration evaluated with our assay when used with field samples is most probably somewhat under-estimated. A standard curve could be designed using samples of known concentrations treated with the same extraction process as the study samples as described previously (Goarant and Mérien, 2006).

This assay was used with environmental samples from a pond affected in 2005 by the “Summer Syndrome” disease, confirming (by a molecular method) the colonization of the shrimp pond ecosystem by the pathogenic cluster at least at the onset of the disease. Additionally, this result confirms that the targeted mutations are stable over time, being found again more than 5 years after the first isolation of this emerging pathogenic strain. Interestingly, the pathogen was seldom found in the outlet channel, even during the mortality outbreak that most probably results in the production of large numbers of pathogens. Considering the dilution factors of the water discharged from the farm, the follow up of the pathogens in the farm’s surrounding environment would necessitate the extraction of bacterial DNA from much larger volumes of seawater, at least in the range of milliliters. This point still has to be studied before using this tool for such a purpose. DNA extraction techniques from large environmental samples have been compared and described by some authors (Boström et al., 2004; Mummy and Findlay, 2004) and must be tested with our samples, formerly demonstrated to contain PCR inhibitors (Goarant and Mérien, 2006). For such a survey or for sanitation purpose, an adequate sampling strategy must also be decided, given the very wide volumes to be considered. As an indication, shrimp ponds in New Caledonia are in the range 1–11 ha with an average of 1 m depth.

Current studies aim at developing molecular tools targeting virulence genes, that would prove even more useful but need longer studies to be conducted. When successfully developed, they will not only permit to study virulence expression but also to evaluate the presence of these virulence genes in other species of the bacterioplankton, virulence genes being frequently mobile genetic elements (Dobrindt and Hacker, 2001; Burrus and Waldor, 2004).

## Acknowledgments

This work was partly supported by grants from the South and North Provinces of New Caledonia, Ifremer and the French Ministry of Research. YR benefits from a PhD grant from Ifremer and the Government of New Caledonia. FM was supported by the International Network of Pasteur Institutes. Thanks are due to F. Vernel-Pauillac and to J.F. Mackay for helpful comments and technical hints and tips.

## References

- Blackstone, G.M., Nordstrom, J.L., Vickery, M.C., Bowen, M.D., Meyer, R.F., DePaola, A., 2003. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. *J. Microbiol. Methods* 53, 149–155.
- Bondad-Reantaso, M.G., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Tan, Z., Shariff, M., 2005. Disease and health management in Asian aquaculture. *Vet. Parasitol.* 132, 249–272.
- Boström, K.H., Simu, K., Hagström, Å., Riemann, L., 2004. Optimization of DNA extraction for quantitative marine bacterioplankton community analysis. *Limnol. Oceanogr. Meth.* 2, 365–373.
- Brenner, D.J., Kaufmann, A.F., Sulzer, K.R., Steigerwalt, A.G., Rogers, F.C., Weyant, R.S., 1999. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genospecies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 839–858.
- Burrus, V., Waldor, M.K., 2004. Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res. Microbiol.* 155, 376–386.
- Cooper, J.E., Feil, E.J., 2004. Multilocus sequence typing — what is resolved? *Trends Microbiol.* 12, 373–377.
- Costa, R., Mermoud, I., Koblavi, S., Morlet, B., Haffner, P., Berthe, F., Le Groumellec, M., Grimont, P., 1998. Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture* 164, 297–309.
- Dobrindt, U., Hacker, J., 2001. Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 550–557.
- Enright, M.C., Spratt, B.G., 1999. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.* 7, 482–487.
- Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D.C., Wengenack, N.L., Rosenblatt, J.E., Cockerill III, F.R., Smith, T.F., 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 165–256.
- Feil, E.J., Enright, M.C., 2004. Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 308–313.
- 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., 1987. BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol. Biol. Evol.* 14, 685–695.
- Goarant, C., Mérien, F., 2006. Quantification of *Vibrio penaeicida*, the etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonian shrimp, by real-time PCR using SYBR Green I chemistry. *J. Microbiol. Methods* 67, 27–35.
- Goarant, C., Mérien, F., Berthe, F., Mermoud, I., Pérolat, P., 1999. Arbitrarily primed PCR to type *Vibrio* spp. pathogenic for shrimp. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1145–1151.
- Goarant, C., Ansquer, D., Herlin, J., Domalain, D., Imbert, F., De Decker, S., 2006a. “Summer Syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture* 253, 105–113.
- Goarant, C., Reynaud, Y., Ansquer, D., De Decker, S., Saulnier, D., Le Roux, F., 2006b. Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 570–580.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.

- Hall, B.G., Barlow, M., 2006. Phylogenetic analysis as a tool in molecular epidemiology of infectious diseases. *Ann. Epidemiol.* 16, 157–169.
- Harvell, C.D., Kim, K., Burkholder, J.M., Colwell, R.R., Epstein, P.R., Grimes, D.J., Hofmann, E.E., Lipp, E.K., Osterhaus, A.D.M.E., Overstreet, R.M., Porter, J.W., Smith, G.W., Vasta, G.R., 1999. Emerging marine diseases — climate links and anthropogenic factors. *Science* 285, 1505–1510.
- Hernandez, G., Olmos, J., 2004. Molecular identification of pathogenic and nonpathogenic strains of *Vibrio harveyi* using PCR and RAPD. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 722–727.
- Hiratsuka, M., Narahara, K., Kishikawa, Y., Hamdy, S.I., Endo, N., Agatsuma, Y., Matsuura, M., Inoue, T., Tomioka, Y., Mizugaki, M., 2002. A simultaneous LightCycler detection assay for five genetic polymorphisms influencing drug sensitivity. *Clin. Biochem.* 35, 35–40.
- Kotetishvili, M., Stine, O.C., Chen, Y., Kreger, A., Sulakvelidze, A., Sozhamannan, S., Morris Jr., J.G., 2003. Multilocus sequence typing has better discriminatory ability for typing *Vibrio cholerae* than does pulsed-field gel electrophoresis and provides a measure of phylogenetic relatedness. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2191–2296.
- Lee, J.H., Han, K.H., Choi, S.Y., Lucas, M.E., Mondlane, C., Ansaruzzaman, M., Nair, G.B., Sack, D.A., von Seidlein, L., Clemens, J.D., Song, M., Chun, J., The Mozambique Cholera Vaccine Demonstration Project Coordination Group, Kim, D.W., 2006. Multilocus Sequence Typing (MLST) Analysis of *Vibrio cholerae* O1 El Tor Isolates from Mozambique that Harbour the Classical CTX Prophage. *J. Med. Microbiol.* 55, 165–170.
- Lightner, D.V., Lewis, D.H., 1975. A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. *Mar. Fish. Rev.* 37, 25–28.
- Lobitz, B., Beck, L., Huq, A., Wood, B., Fuchs, G., Faruque, A.S., Colwell, R., 2000. Climate and infectious disease: use of remote sensing for detection of *Vibrio cholerae* by indirect measurement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 1438–1443.
- Mermoud, I., Costa, R., Ferré, O., Goarant, C., Haffner, P., 1998. Syndrome 93 in New Caledonian outdoor rearing ponds of *Penaeus stylirostris*: history and description of the three major outbreaks. *Aquaculture* 164, 323–335.
- Mumy, K.L., Findlay, R.H., 2004. Convenient determination of DNA extraction efficiency using an external DNA recovery standard and quantitative-competitive PCR. *J. Microbiol. Methods* 57, 259–268.
- Oakey, H.J., Owens, L., 2000. A new bacteriophage, VHML, isolated from a toxin-producing strain of *Vibrio harveyi* in tropical Australia. *J. Appl. Microbiol.* 89, 702–709.
- O’Shea, Y.A., Reen, F.J., Quirke, A.M., Boyd, E.F., 2004. Evolutionary genetic analysis of the emergence of epidemic *Vibrio cholerae* isolates on the basis of comparative nucleotide sequence analysis and multilocus virulence gene profiles. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4657–4671.
- Overbergh, L., Giuletti, A., Valckx, B., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C., 2003. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J. Biomol. Tech.* 14, 33–43.
- Panicker, G., Myers, M.L., Bej, A.K., 2004. Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and gulf of Mexico water by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 498–507.
- Rañoa, D.R.E., Hedreyda, C.T., 2005. Sequence analysis of partial *toxR* gene from Philippine *Vibrio* isolates and design of *toxR*-targeted primers for detection. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 51, 343–351.
- Saulnier, D., Haffner, P., Goarant, C., Levy, P., Ansquer, D., 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture* 191, 133–144.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Urwin, R., Maiden, M.C.J., 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* 11, 479–487.
- Vernel-Pauillac, F., Falcot, V., Whiley, D., Merien, F., 2006. Rapid detection of a chromosomally mediated penicillin resistance-associated *ponA* mutation in *Neisseria gonorrhoeae* using a real-time PCR assay. *FEMS Microbiol. Lett.* 255, 66–74.
- Whalley, S.A., Brown, D., Teo, C.G., Dusheiko, G.M., Saunders, N.A., 2001. Monitoring the emergence of hepatitis b virus polymerase gene variants during lamivudine therapy using the LightCycler. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1456–1459.

## **Annexe III – Article 3**

Soumis dans Applied in Environmental Microbiology en 2007

**“Correlation between the detection of a plasmid and high virulence of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*”**

**Title: Correlation between the detection of a plasmid and high virulence of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of the shrimp *Litopenaeus stylirostris***

**Running title:** *V. nigripulchritudo* plasmid and virulence

Yann Reynaud<sup>1,2</sup>, Denis Saulnier<sup>1</sup>, Didier Mazel<sup>3</sup>, Cyrille Goarant<sup>2#</sup>, and Frédérique Le Roux<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de génétique et pathologie, Ifremer, BP33, 17390 La Tremblade, France

<sup>2</sup> Département Aquaculture en Nouvelle-Calédonie, Ifremer, BP 2059, 98846 Nouméa cedex, Nouvelle-Calédonie.

<sup>3</sup> Unité Postulante Plasticité du Génome Bactérien, CNRS URA 2171, Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75724, Paris, France.

# Present address: LRB, Institut Pasteur de Nouvelle Calédonie, BP 6198845 Nouméa Cedex, New Caledonia

\* **Corresponding author:** Frédérique Le Roux

Tel 33 1 40 61 32 87, Fax 33 1 45 68 88 34, fleroux@pasteur.fr

## ABSTRACT

*Vibrio nigripulchritudo*, the etiological agent of *Litopenaeus stylirostris* summer syndrome, is responsible for mass mortalities of shrimps in New Caledonia. Epidemiological studies led to the suggestion that this disease is caused by an emergent group of pathogenic strains. Genomic subtractive hybridization was carried out between two isolates exhibiting low and high virulence. Our subtraction library was constituted by 521 specific fragments, 55 of these were detected in all virulent isolates from our collection (n=32) and 13 were only detected in the isolates demonstrating the highest pathogenicity (n=19) suggesting that they could be used as genetic markers for high virulence capacity. Interestingly, 10 of these markers are carried by a replicon of 11.2 kbp that contains sequences highly similar to those of a plasmid detected in *Vibrio shilonii*, a coral pathogen. The detection of this plasmid was correlated with the highest pathogenicity status of the isolates from our collection. The origin and consequence of this plasmid acquisition are discussed.

## INTRODUCTION

Vibriosis are important diseases threatening the sustainable development of the penaeid shrimp aquaculture industry (6, 7, 20, 21). However, little research attention has been paid to these diseases, mostly because viruses are considered as the most significant diseases in crustacean aquaculture (22). As a result solutions to control vibriosis remain scarce. The massive use of antibiotics is certainly not a sustainable control strategy since it favours emergence of antibiotic resistant strains (17). Moreover, antibiotics are often banned from aquaculture ponds for commercial reasons and because of the increasing concern for residue issues. Additionally, vaccination is not possible in invertebrates thereby limiting the ways to reduce disease impact in shrimp culture (2). Therefore, there is a need to understand the environmental, physiological and bacterial conditions leading to the expression of a disease in order to determine ecological or zootechnical methods that could in the end control these diseases (16). One step consists in diagnosing and quantifying the etiologic agent of a disease, both in the reared animal and in its environment.

It is recognized that strains belonging to a same *Vibrio* species can have different virulence patterns ranging from highly pathogenic strains to non-virulent ones (8, 13, 19). Therefore, the diagnosis often needs to be infraspecific i.e. based on epidemiologically relevant sequence polymorphisms that can be regarded as genetic markers of virulence (9, 25).

Suppressive Subtractive Hybridization (SSH) has been successfully and extensively used in a wide range of bacterial species to identify strain-specific genes (14, 32, 33). In case of virulent versus non-virulent strains comparison, the differential genes evidenced may encode for virulence factors. Moreover, identifying these strain-specific regions can help to bring to evidence the trace of horizontal gene transfers (HGT) that are known to provide selective advantages and to be implicated in the emergence of new pathogen (4, 10, 24).

In New-Caledonia (South Pacific, 19°S/23°S), a disease called “summer syndrome” has occurred seasonally in penaeid shrimp farms since 1997 and causes severe epizootic mortalities. A multidisciplinary research program aiming at a global understanding of this disease was set up, bringing together rearing technology, pond ecosystem studies, shrimp physiology and immunology, nutrition and genetics, pathology and bacteriology approaches (11). Epidemiological studies have revealed that this disease is a vibriosis due to highly pathogenic *Vibrio nigripulchritudo* isolates (7, 8). To the best of our knowledge, this is the first reported disease associated with this *Vibrio* species. Because the New Caledonian shrimp production is also affected by another vibriosis, namely syndrome 93 occurring during the cool season (6), the spreading of the summer syndrome to other shrimp farms would undoubtedly threaten the sustainable development of the New Caledonian shrimp industry. Preliminary studies based on a collection of *V. nigripulchritudo* isolates have brought to light different virulence levels according to experimental infection results (7). The genetic structure of 58 *V. nigripulchritudo* selected isolates was then studied using Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) and Multilocus Sequence Typing (MLST) (8). These two typing methods gave congruent results revealing a clustering of highly pathogenic (HP) and moderately pathogenic isolates (MP). None of the non pathogenic (NP) isolates were present in this cluster. The hypothesis of the emergence of this particular cluster of pathogenic *V. nigripulchritudo* within a shrimp farm environment has been proposed. This emergence could be linked to the recent acquisition of one or several genetic elements leading a moderately virulent isolate to become highly pathogenic.

Our study was aimed at identifying and characterizing genetic markers of *V. nigripulchritudo* virulence by a Suppressive Subtractive Hybridization performed between the genomes of a HP isolate and a genetically close, NP isolate. In a second step, the distribution of the screened SSH fragments was studied in a selection of both virulent (either HP or MP) and

NP *V. nigripulchritudo* isolates by macro-array. This allowed us to determine more precisely which DNA fragments are constantly associated with the virulence and could possibly be part of the virulence determinants. Lastly, the discovery of a replicon detected only in HP *V. nigripulchritudo* isolates, leads to a discussion of the role of mobile genetic elements in the emergence of pathogenicity in *V. nigripulchritudo*.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Bacterial strains media and DNA extraction**

The *V. nigripulchritudo* isolates used in this study have been described previously and are presented in Table 1 (8). The *V. shilonii* strain AK1 was purchased from the Pasteur Institute collection (CIP107136T). *Vibrio* strains were grown in marine broth (MB) or marine agar (MA) at 30°C. *E. coli* strains were routinely grown in Luria-Bertani (LB) at 37°C. All media were from Difco. When necessary, media were supplemented with ampicillin (100 µg/ml). Total genomic DNA from *Vibrio* strains was prepared as described previously (30).

### **Polymerase chain reaction (PCR)**

Long range PCR was performed using Herculase DNA polymerase fusion II to amplify the entire plasmid of *V. nigripulchritudo* or *V. shilonii* following the manufacturer's instructions (<http://www.stratagene.com>). Other PCR reactions were performed using the Bioline Taq polymerase according to the manufacturer's instructions. Conditions for amplification were as follows: 94°C for 3 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, (T<sub>m</sub>-10°C) for 30 s, and 72°C for 60 s per kbp.

### **Suppression subtractive hybridization and macroarrays**

SSH was carried out using the PCR-Select Bacterial Genomic Subtraction Kit (<http://www.clontech.com/>) essentially following the manufacturer's instructions. Isolate SFn1 (HP) genomic DNA was used as the tester and SFn118 (NP) genomic DNA was used as the driver DNA. During SSH, a high annealing temperature of 63°C was used to enrich for the recovery of SFn1-specific unique sequences. The PCR products obtained from SSH, representing tester-specific sequences, were cloned into pCRII-TOPO (<http://www.invitrogen.com/>) and transformed into *E. coli* strain TOP10.

Recombinant clones were screened by macro-arrays. Briefly, inserts were PCR amplified and spotted in duplicate onto nylon membranes (<http://www.millipore.com/>). Genomic DNAs were labelled and used as probe in hybridisation experiments using the DIG-labelling and detection kit according to the manufacturer instruction (<http://www.rochediagnostics.fr/>).

### **DNA sequencing and sequences analysis**

DNA to sequence were amplified using a Templi Phi Amplification Kit (<http://www.amersham.com/>) and sequenced on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (<http://www.appliedbiosystems.com/>) following manufacturer instructions. DNA sequences were blasted on public databases using blastX algorithm (1). Similarities with an E-value smaller than  $10^{-5}$  were considered significant. Sequencing, contig assemblies were performed by using SEQMAN (Lasergene software).

### **Plasmid extraction and characterisation**

Plasmidic DNA extractions trials were conducted using different commercial kits, namely Qiafilter Plasmid Midi kit (<http://www1.qiagen.com/>), Plasmid Midiprep kit

(<http://www.sigmaaldrich.com>) and Wizard DNA Purification System (<http://www.promega.com/>) following the instructions of the manufacturers.

Plasmids were digested with restriction enzymes *EcoRI* and *XhoI*, size fractionated by 1% agarose electrophoresis and analysed by Southern blot (30). For this, a fragment of the plasmid pSFn1 (SSH clone 16) was PCR amplified and labelled using the Dig Labelling system (Roche).

Complete sequences of pSFn1 and pAK1 were obtained by shot gun sequencing. After *SauIIIa* partial digestion the purified 3 kbp to 8 kbp restriction DNA fragments were ligated in a pUC18 vector predigested by *BamHI* (Amersham) and transformed into TOP10 competent cells (Invitrogen). ORFs annotation was performed using GeneMark software and syntenic analysis using Artemis software.

#### **Nucleotide sequence accession numbers**

The DNA sequences of the plasmid pSFn1 and pAK1 have been assigned the accession number respectively EU156059 and EU159455.

## **RESULTS**

#### **Genomic subtraction between *V. nigripulchritudo* isolates**

A Suppressive Subtractive Hybridization was carried between the HP isolate SFn1 and the NP isolate SFn118. In order to check the specificity of the technique, a total of 1112 inserts from the SSH library was screened by macro-array using SFn1 or SFn118 genomic DNA as probe. 622 SFn1-specific fragments were selected revealing 44.1% of non-specific DNA fragments. Sequencing of the SFn1 specific fragments resulted in 521 DNA sequences among which 143 (27.4%) showed no significant matches with entries in the public database. The remaining

378 predicted ORFs showed homology to proteins described in other bacterial species, and among them 43 (18.9%) corresponded to conserved hypothetical proteins.

### **Correlation between macroarrays and virulence status**

In a first set of experiments, macro-arrays were performed using the 521 SFn1-specific DNA fragments as targets and a collection of 19 *V. nigripulchritudo* genomic DNA as probes. This allowed the selection of 68 DNA fragments: 13 were found only in the DNA of the HP isolates whereas 55 were present in both HP and MP isolates (n=5 and 6 isolates, respectively). The 8 NP isolates genomic DNA hybridized with almost none of the 68 selected DNA fragments. In a second set of experiments, the 68 fragments specific to the pathogenic isolates (both HP and MP) were spotted on membranes that were then hybridized with genomic DNA extracted from 33 additional *V. nigripulchritudo* isolates. Hybridization profiles were correlated with virulence status i.e. 13 fragments were found specific to the 19 HP isolates, 55 fragments were found in HP and in MP isolates and only a few fragments (n=23) were found sporadically in NP isolates (Fig. 1).

Among the 68 putative ORFs inferred, the homology search suggests that some could play a role in the virulence process (Table 2). Clone 106 presents similarity to a vulnibactin outer membrane receptor precursor, clone 198 to an RTX protein or autotransporter adhesin, clone 458 to cyanobacterial toxins and clone 486 to a capsule biosynthesis protein CapA. Nine putative ORFs (13%) showed homology with transposase, integrase or other proteins implicated in recombination suggesting a role of mobile elements in the SFn1 genome specificity.

### **Identification and genetic organisation of the pSFn1 plasmid**

Within the subgroup of SSH fragments detected only in HP isolates, 3 clones (clone 16, 68 and 155) contained a partial ORF with high similarity to two genes (Z2Z3 and Z8) found in one of the plasmids evidenced in *V. shilonii* (Rosenberg *et al.*, unpublished data).

Previous experiments using the protocol described by Kado and Liu (15) failed to demonstrate the presence of a plasmid in *V. nigripulchritudo* isolates. Since the detection of fragments Z2Z3 and Z8 suggested the presence of a plasmid in SFn1, three additional extraction protocols were tested; only the Qiafilter Plasmid Midi Kit (Qiagen) allowed purification of a replicon from this isolate.

The complete sequence of the replicon named pSFn1 (11237 bp) was obtained and the putative ORFs identified using GeneMark software. A graphical representation of the 10 predicted ORFs appears in the Figure 2A. Their relationships to their homologues in databases are detailed in Table 2. Five ORFs showed significant similarity with known genes coding for: a putative partitioning protein (ORF2) a putative phage tail protein (ORF4), a phage head-tail tape measure protein (ORF5), a serine peptidase S49 family (ORF6) and an activator of ProP osmoprotectant transporter (ORF10). Two ORFs correspond to conserved hypothetical protein (ORF3 and 8) and three are unknown (ORF1, 7 and 9).

Among the 13 DNA fragments that were demonstrated to be present in all HP isolates, 10 were localized in this plasmid pSFn1.

### **Correlation between plasmid and virulence**

The successful plasmid extraction procedure was conducted with a larger panel of isolates. A single plasmid was evidenced in 4/4 additional HP isolates (SFn27, SFn135, POn19, POn3). In 1/8 MP (AQn1) and 1/7 NP (AgMn1) isolates one or more plasmid(s) were also purified.

RFLP analysis of the plasmids was performed using *EcoRI* or *XhoI* restriction enzymes and demonstrated that these 4 HP isolates harbour a plasmid identical or very similar to pSFn1 with 3 *EcoRI* restriction fragments (1.1, 3.4, and 6.6 kbp) and one *XhoI* linearized plasmid of 11.2 kbp. In case of isolates AQn1 and AgMn1 *EcoRI* and *XhoI* plasmid restriction profiles were found to be clearly distinct (data not shown). Furthermore double digestions suggest a single larger plasmid or the existence of several plasmids. Results were confirmed by southern blot using SSH Fragment 16 as probe. An *EcoRI* digested fragment of 3.4 kbp (in pSFn1) was evidence only in all tested HP isolates.

### **Comparison between pSFn1 and the plasmid pAK1 of *V. shilonii***

The same plasmidic extraction procedure was used successfully to purify plasmid from *V. shilonii* strain AK1. In agreement with Rosenberg *et al.* (unpublished data) more than one plasmid was obtained. Among several primers designed on the basis of the pSFn1 sequence, primers 9F and 9R, localised between ORF5 and 6, were successfully used to amplify by inverse PCR a fragment of 13.4 kbp which was further sequenced to provide the complete sequence of one of the AK1 plasmids, named pAK1. As for pSFn1, the putative ORFs were identified using GeneMark software.

A DNA:DNA comparison between plasmids showed that 71.8% of pSFn1 was shared with pAK1, with 93% of nucleotidic identity for these sequences (Fig. 2B). Syntheny analysis highlight that 5 regions were significantly similar between pSFn1 and pAK1 (score>500).

## **DISCUSSION**

Compared to human bacterial pathogens, little is known concerning *Vibrio* pathogenesis in marine invertebrates. The genetic diversity of *Vibrio* as well as the complexity of virulence

mechanisms causes difficulties in diagnosing vibriosis. Among approaches that can be proposed to investigate genetic markers of pathogenicity

Whole genome sequencing appears as the most informative approach as it has significantly improved our understanding of the physiology and pathogenicity of many microbes and provided insights into the mechanisms and history of genome evolution (5). The genomes of four *Vibrio* species have already been sequenced: *V. cholerae* (12), *V. parahaemolyticus* (23), *V. vulnificus* (3), and *V. fischeri* (29). This makes comparative genomics an attractive approach to investigate the basis of virulence in *Vibrio*. However, in spite of recent progress in high density sequencing method, this approach is still laborious and expensive and as a consequence is restricted to a limited number of strains. Furthermore, if whole genome sequencing allows to rapidly and extensively hypothesize virulence mechanisms based on putative virulence determinants deduced from known functions of heterologous or orthologous known sequences, the functional demonstration of their involvement in virulence would still rely on mutagenesis and complementation of the candidate genes.

Subtractive hybridization methods are techniques designed to identify genomic regions that are present in one genome but absent from another (32). The application of such a method has led to the identification of genomic islands (26), mobile genetic elements (31) and plasmids (18). In case of virulent versus non-virulent strain comparison, such regions could correspond to virulence genes or regulators. Therefore this relatively simple and cheap technique is attractive to investigate genomic variation and identify virulence factors.

In a former study, a collection of *V. nigripulchritudo* isolates was studied in order to gain a better understanding of the epidemiology of this pathogen in New Caledonia (7, 8). Bacteria phenotypically related to this species were isolated from shrimps suffering “Summer Syndrome” or from other contexts and over a wider geographical coverage (Table 1). Molecular typing using two different techniques, Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) and

Multi Locus Sequence Typing (MLST) were congruent and permitted the definition of a cluster which included all “Summer Syndrome” isolates from diseased animals, from the two affected farms whatever their date of isolation. Together with these isolates, a few environmental isolates from the affected farms (sediment or pond water) suggest that they may be environmentally-transmitted.

By experimental infection the isolates of this cluster were demonstrated to be moderately to highly pathogenic. This sum of data led us to hypothesize that the Summer Syndrome is attributable to a single pathogenic clone, surviving from one year to the next in the shrimp farm environment then re-developing inside the grow out system at the next crop.

The correlation between virulence phenotype and taxonomic markers suggests that virulence genes, at least in part, are carried by one of the two chromosomes. However because genotyping studies do not allow distinguishing HP isolates from MP ones, more recent genetic events can be suspected to be at the origin of HP isolate emergence inside this cluster. Such a recent evolution often implies mobile elements that can be tracked by the SSH approach.

In the present study, the SSH approach comparing an HP versus an NP isolate allowed to identify 13 fragments specific for the HP isolates. Among these fragments 10 corresponded to putative ORFs harboured by a plasmid, pSFn1, evidenced only in the HP isolates and showing high similarities with a 13.5 kbp plasmid described in *V. shilonii* (Rosenberg et al., unpublished data). This latter *Vibrio* was also putatively identified, together with *V. nigripulchritudo*, in corals along the coasts of Florida (27) suggesting that *V. nigripulchritudo* and *V. shilonii* can coexist in a same ecological niche.

Our hypothesis is that coral or shrimp as other marine invertebrate with the millions of resident bacteria that are concentrated in their different compartments, as a niche, could be a

suitable place for horizontal gene transfer. The bacterial genomic plasticity could be at the origin of variable adaptive functions, leading to the capacity to colonize different ecological niches. Therefore coral, shrimp or other invertebrates, could be at the origin of plasmid transfer.

*V. shilonii* has been associated with coral bleaching events in *Oculina patagonica* in the Mediterranean Sea. Many data concerning the temperature-regulated mechanism of infection, virulence mechanisms and pathogen transmission have been obtained experimentally with the strain AK1 (28). However no data concerning the epidemiological survey *in situ* are available. As a consequence the absence of results concerning the identification of plasmids within a collection of *V. shilonii* prevents a discussion of the role of this plasmid in the virulence of *V. shilonii*.

Here the presence of the plasmid pSFn1 has been clearly correlated with the HP status of *V. nigrripulchritudo* isolates suggesting that this element had played a role in the HP emergence.

One hypothesis is that this plasmid harbours one or more genes involved in bacterial virulence and could be considered as a plasmid linked to virulence. However because no ORFs annotated in the plasmid can be clearly assigned to a pathogenicity factor, genetic approaches should be developed to investigate the role of this plasmid in virulence: pSFn1 curing, pSFn1 transferring and ORFs deletion require experimental development that are currently in progress.

Furthermore the identification of 3 SSH fragments, HP specific, and absent from the plasmid, suggests that several virulent determinant are chromosomally localised. Further knock out strategies should target genomic virulence markers.

Hybridization analysis using 68 SSH-derived fragments appears more discriminating than MLST or AP-PCR because it allows the distinction of the HP from the MP isolates. Our results could lead in the future to the development of relevant tools for diagnosis of HP isolates, for instance a plasmid-specific PCR, thereby avoiding the need to characterize virulence by experimental infection. Those operational tools will allow evaluating the impact of this vibriosis on shrimp aquaculture in New Caledonia.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors acknowledge Dominique Ansquer for technical help, Mohammed Zouine for plasmid comparison analysis and Dr Collin Tinsley for critical reading of the manuscript. This study was carried out with financial support of the South and North Provinces and the Government of New Caledonia, the Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), the Institut Pasteur (CNRS URA2171) and the Institut de Génomique Marine (contrat Ministère de la Recherche n°0425).

## REFERENCES

1. **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids. Res.* **25**:3389-3402.
2. **Bachere, E.** 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture.* **191**:3-11.
3. **Chen, C., K. Wu, Y. Chang, C. Chang, H. Tsai, T. Liao, Y. Liu, H. Chen, A. B. Shen, J. Li, T. Su, C. Shao, C. Lee, L. Hor, and S. Tsai.** 2003. Comparative Genome Analysis of *Vibrio vulnificus*, a Marine Pathogen. *Genome Res.* **13**:2577-2587.
4. **Faruque, S. M., and J. J. Mekalanos.** 2003. Pathogenicity islands and phages in *Vibrio cholerae* evolution. *Trends Microbiol.* **11**:505-510.
5. **Fraser-Liggett, C. M.** 2005. Insights on biology and evolution from microbial genome sequencing. *Genome Res.* **15**:1603-1610.
6. **Goarant, C., J. Herlin, D. Ansquer, R. Brizard, and A.L. Marteau.** 2004. *Vibrio penaeicida* and Syndrome 93 in New Caledonian prawn farming: review and perspectives, **38**, p. 203-209. In C. Goarant, A. Herbland, Y. Harache, C. Mugnier (ed.), Styli 2003, Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie, Ifremer ed., Actes Colloq. (in French with English abstract).
7. **Goarant, C., D. Ansquer, J. Herlin, D. Domalain, F. Imbert, and S. De Decker.** 2006a. "Summer Syndrome" in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture.* **253**:105-113.
8. **Goarant, C., Y. Reynaud, D. Ansquer, S. de Decker, D. Saulnier, and F. Le Roux.** 2006b. Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**:570-580.

9. **Goarant, C., Y. Reynaud, D. Ansquer, S. de Decker, and F. Merien.** 2007. Sequence polymorphism-based identification and quantification of *Vibrio nigripulchritudo* at the species and subspecies level targeting an emerging pathogen for cultured shrimp in New Caledonia. *J. Microbiol. Methods.* **70**:30-38.
10. **Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer, and H. Tschape.** 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* **23**:1089-1097.
11. **Harache, Y., and A. Herbland.** 2004. Le programme DESANS (Défi Santé *Stylirostris*): une démarche comparable au Défi MOREST appliquée à la filière crevette Calédonienne, 38 p. 31–38. In C. Goarant, A. Herbland, Y. Harache, C. Mugnier (ed.), *Styli 2003, Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie*, Ifremer ed., Actes Colloq. (in French with English abstract).
12. **Heidelberg, J. F., J. A. Eisen, W. C. Nelson, R. A. Clayton, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, L. Umayam, S. R. Gill, K.E. Nelson, T. D. Read, H. Tettelin, D. Richardson, M. D. Ermolaeva, J. Vamathevan, S. Bass, H. Qin, I. Dragoi, P. Sellers, L. McDonald, T. Utterback, R. D. Fleishmann, W. C. Nierman, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, R. R. Colwell, J. J. Mekalanos, J. C. Venter, and C. M. Fraser.** 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature.* **406**:477-483.
13. **Hernandez, G., and J. Olmos.** 2004. Molecular identification of pathogenic and nonpathogenic strains of *Vibrio harveyi* using PCR and RAPD. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**:722-727.
14. **Juiz-Río, S., C. R. Osorio, V. de Lorenzo, and M. L. Lemos.** 2005. Subtractive hybridization reveals a high genetic diversity in the fish pathogen *Photobacterium*

- damselae* subsp. *piscicida*: evidence of a SXT-like element. *Microbiology*. **151**:2659-2669.
15. **Kado, C. I., and S. T. Liu.** 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**:1365-1373.
  16. **Kautsky, N., P. Ronnback, M. Tedengren, and M. Troell.** 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture*. **191**:145-161.
  17. **Le, T., X., Y. Munekage, and S. Kato.** 2005. Antibiotic resistance in bacteria from shrimp farming in mangrove areas. *Sci. Total Environ.* **349**:95-105.
  18. **Lee, C., C. Amaro, E. Sanjuán, and L. Hor.** 2005. Identification of DNA sequences specific for *Vibrio vulnificus* Biotype 2 strains by Suppression Subtractive Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:5593-5597.
  19. **Le Roux, F., M. Gay, C. Lambert, J. L. Nicolas, M. Gouy, and F. Berthe.** 2004. Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences. *Dis. Aquat. Org.* **58**:143-150.
  20. **Lightner, D. V.** 1988. *Vibrio* disease of penaeid shrimp, p. 42-47. In C. J. Sindermann, and D. V. Lightner (ed.), *Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
  21. **Lightner, D. V., and D. Lewis.** 1975. A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. *Mar. Fish. Rev.* **37**:25-28.
  22. **Lightner, D. V., and R. M. Redman.** 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*. **164**:201-220.
  23. **Makino, K., K. Oshima, K. Kurokawa, K. Yokoyama, T. Uda, K. Tagomori, Y. Iijima, M. Najima, M. Nakano, A. Yamashita, Y. Kubota, S. Kimura, T. Yasunaga, T. Honda, H. Shinagawa, M. Hattori, and T. Iida.** 2003. Genome sequence of *Vibrio*

- parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *Vibrio cholerae*. *The Lancet*. **361**:743-749.
24. **Ochman, H., J. G. Lawrence, and E. A. Groisman**. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*. **405**:299-304.
  25. **Rañoa, D. R. E., and C. T. Hedreyda**. 2005. Sequence analysis of partial *toxR* gene from Philippine *Vibrio* isolates and design of *toxR*-targeted primers for detection. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **51**:343-351.
  26. **Reckseidler, S. L., D. DeShazer, P. A. Sokol, and D. E. Woods**. 2001. Detection of Bacterial Virulence Genes by Subtractive Hybridization: Identification of Capsular Polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* as a Major Virulence Determinant. *Infect. Immun.* **69**:34-44.
  27. **Ritchie, K. B.** 2006. Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **322**:1-14.
  28. **Rosenberg, E., and L. Falkovitz**. 2004. The *Vibrio shiloi/Oculina patagonica* model system of coral bleaching. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**:143-159.
  29. **Ruby, E. G., M. Urbanowski, J. Campbell, A. Dunn, M. Faini, R. Gunsalus, P. Lostroh, C. Lupp, J. McCann, D. Millikan, A. Schaefer, E. Stabb, A. Stevens, K. Visick, C. Whistler, and E. P. Greenberg**. 2005. Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: A symbiotic bacterium with pathogenic congeners. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**:3004-3009.
  30. **Sambrook, J., and D. W. Russel**. 2001. Molecular Cloning. A laboratory manual, 3rd ed. *Cold Spring Harbor press, New York, NY*.
  31. **Sawada, K., S. Koikeguchi, H. Hongyo, S. Sawada, M. Miyamoto, H. Maeda, F. Nishimura, S. Takashiba, and Y. Murayama**. 1999. Identification by subtractive

hybridization of a novel insertion sequence specific for virulent strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* **67**:5621-5625.

32. **Winstanley, C.** 2002. Spot the difference: applications of subtractive hybridisation to the study of bacterial pathogens. *J. Med. Microbiol.* **51**:459-467.
33. **Zhang, Y. L., C. T. Ong, and K. Y. Leung.** 2000. Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. *Microbiology.* **146**:999-1009.

## LEGENDS OF FIGURES

**FIG. 1.** Correlation between subtracted fragments of genomic DNA from *V. nigripulchritudo* SFn1 and virulence statuses, summary of macro-array results. Hybridizations were performed using the 68 SFn1-specific DNA fragments as target and a collection of 51 *V. nigripulchritudo* DNA as probes. Name and virulence status of strains are indicated in ordinate, DNA subtracted fragment are indicated in abscissa in the same order than in the Table 1. Positive signals are indicated in grey.

### **FIG. 2.**

**A:** ORF map of the 11237 bp plasmid pSFn1. The orientation of the putative ORFs is indicated by the orientation of the arrows; in black, ORFs with significant sequence similarities with BlastX algorithm on GenBank; in grey, putative ORFs for which no significant similarity was found.

**B:** Linear comparison of pSFn1 and pAK1 plasmids. The ORFs of the two strands are indicated by grey arrows when no significant blast were obtained, and black arrows when significant blast were obtained. ORF2 encodes an ATPase involved in partitioning protein, ORF 4 and 5 encode a phage tail tape measure protein TP901, ORF6 encode a serine peptidase S49 family, ORF10 encode an activator of ProP osmoprotectant transporter, ORF11 encode a putative tail length determinator, ORF3, 8, 12 and 13 encode conserved hypothetical protein, ORF1, 7 and 9 encode an unknown hypothetical protein. The grey lines between the plasmid represent DNA:DNA similarities (BlastN matches between the two sequences, score>500).

**Table 1.** *V. nigripulchritudo* strains and field isolates used in the present study. In bold: isolates from farms which are affected by the Summer Syndrome. In italics: isolates collected during surveys specifically dedicated to the isolation of *V. nigripulchritudo* strains. Virulence as determined in text: HP stands for highly pathogenic strain, MP for moderately pathogenic and NP for non pathogenic.

Strain name	context	Virulence to <i>L. stylirostris</i>
CIP 103195T	<i>V. nigripulchritudo</i> type strain	NP
<b>SFn1</b>	Summer syndrome, moribund shrimp hemoculture	HP
<b>SFn2</b>	Summer syndrome, moribund shrimp hemoculture	HP
<i>SFn27</i>	Sediment pore water, diseased pond	HP
<b>SFn48</b>	Summer syndrome, moribund shrimp hemoculture	HP
<i>SFn49</i>	Growout pond water, diseased pond	HP
<i>SFn105</i>	Growout pond water, diseased pond	HP
<b>SFn106</b>	Summer syndrome, moribund shrimp hemoculture	HP
<i>SFn111</i>	Carapace of a healthy crab ( <i>Portunus pelagicus</i> ), diseased farm	NP
<i>SFn115</i>	Lagoon water in front of pumps, diseased farm	NP
<i>SFn118</i>	Lagoon water in front of pumps, diseased farm	NP
<i>SFn127</i>	Healthy shrimp hemoculture, before disease outbreak	HP
<b>SFn128</b>	Summer syndrome, moribund shrimp hemoculture	HP
<i>SFn135</i>	Growout pond water, diseased pond	HP
<i>AgMn1</i>		NP
<i>AgMn2</i>	Healthy shrimp hemoculture, before disease outbreak (same animal)	NP
<i>AgMn3</i>		NP
<i>AgMn7</i>	Healthy shrimp hemoculture, before disease outbreak	HP
<b>AgMn8</b>	Summer syndrome, moribund shrimp hemoculture	HP
<i>AgMn9</i>	Growout pond water, diseased pond	HP
<b>AgMn10</b>	Summer syndrome, moribund shrimp hemoculture	HP
<i>AgMn12</i>	Sediment pore water, diseased pond	HP
<i>AgMn13</i>	Sediment pore water, diseased pond	HP
<i>POn2</i>	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond 2, healthy farm	HP
<i>POn3</i>	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond 3, same healthy farm	HP
<i>POn4</i>	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond 6, same healthy farm	NP
<i>POn10</i>	Moribund shrimp hemoculture, no vibriosis, healthy pond 5, same healthy farm	NP
<i>POn12</i>	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond 4, same healthy farm	NP
<i>POn13</i>	Healthy shrimp hemoculture, same healthy pond 4, same healthy farm	NP
<i>POn19</i>	Healthy shrimp hemoculture, same healthy pond 4, same healthy farm	HP
<i>SOn1</i>	Moribund shrimp hemoculture, no vibriosis	NP
<i>SOn2</i>	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond, healthy farm	NP
FTn1	Moribund shrimp hemoculture, no vibriosis	NP
<i>SBn2</i>	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond, healthy farm	NP
Wn1	Moribund shrimp hemoculture, opportunistic vibriosis	MP
Wn3	Moribund shrimp hemoculture, opportunistic vibriosis	MP
Wn13		MP
Wn14	Moribund shrimp hemoculture, opportunistic vibriosis (same animal)	MP
<i>BDn1</i>	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond, healthy farm	MP
<i>BDn2</i>	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond, healthy farm	MP
<i>Fn1</i>	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond, healthy farm	MP
<i>Fn2</i>	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond, healthy farm	NP
<i>AQn1</i>	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond, healthy farm	MP
<i>AQn2</i>	Healthy shrimp hemoculture, healthy pond, healthy farm	MP
MT1	Moribund shrimp hemoculture, opportunistic vibriosis, broodstock	MP
BLFn1	Moribund shrimp hemoculture, opportunistic vibriosis	MP
BLFn2	Moribund shrimp hemoculture, opportunistic vibriosis	MP
<i>ENn1</i>	Healthy shrimp hemoculture, healthy broodstock	NP
<i>ENn2</i>	Healthy shrimp hemoculture, healthy broodstock	MP
SVn2	Moribund shrimp hemoculture, no vibriosis	NP
<i>SVn3</i>	Healthy shrimp hemoculture, healthy farm	NP
<i>ESn2</i>	Healthy shrimp hemoculture, healthy broodstock	NP

**Table 2.** Summary of the sequence analysis of clones inserts specific for pathogenic strains of *V. nigrispulchritudo* and absent from non pathogenic strains. Virulence gene candidates are indicated in bold characters.

	SSH clone	Genbank accession N°	SSH DNA fragment size (bp)	predicted protein (bp)	homology	blast	E value	identity (%)	homologue accession N°
specific DNA fragments of the HP strains	16=ORFpSFa1 N°6	ET024018	459	990	13.5 kbp plasmid sequence Z2Z3, putative serine peptidase S49 [ <i>Vibrio shilonii</i> AK1]	n	9E-175	92	AAB65791
	64	ET023962	427	1380	hypothetical protein VV0144 [ <i>Vibrio vulnificus</i> YJ016]	x	6E-76	97	NP_932937
	68=ORFpSFa1 N°7	ET024019	250	553	13.5 kbp plasmid sequence Z8	n	7E-57	94	AF009903
	104	ET023965	415	2691	hypothetical protein Neut_2547 [ <i>Nitrosomonas eutropha</i> C71]	x	2E-48	72	AB160750
	155=ORFpSFa1 N°7	ET024020	312	553	13.5 kbp plasmid sequence Z8 [ <i>Vibrio shilonii</i> AK1]	n	5E-86	88	AF009903
	191=ORFpSFa1 N°4	ET024021	323	1788	predicted phage tail protein [ <i>Vibrio vulnificus</i> ]	x	2E-05	45	ABB90701
	284=ORFpSFa1 N°8	ET024022	262	1035	hypothetical protein R2601_22861 [ <i>Roseovarius</i> sp. HTCC2601]	x	5E-04	55	ZP_01444696
	302=ORFpSFa1 N°5	ET024023	367	2280	Phage tail tape measure protein TP901, core region [ <i>Thiomicrospira crunogena</i> XCL-2]	x	4E-16	40	YP_390968
	378	ET024024	277	-	Unknown COG	x	-	-	-
	414	ET024025	537	-	Unknown COG	x	-	-	-
	506	ET024007	405	909	Predicted transcriptional regulator [ <i>Vibrio alginolyticus</i> 12G01]	x	2E-05	47	ZP_01259885
	522=ORFpSFa1 N°5	ET024026	405	1815	putative tail length determinant [Bacteriophage K139]	x	2E-13	35	NP_536663
	535=ORFpSFa1 N°3	ET024027	365	489	hypothetical protein pC46022_21, <i>Vibrio vulnificus</i>	x	3,00E-33	53	YP_001393180
	39	ET023960	187	-	Unknown COG	x	-	-	-
	55	ET023961	416	765	tsaC, RSc2351; probable toluenesulfonate zinc-independent alcohol dehydrogenase oxidoreductase protein [ <i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2]	x	6E-15	63	ZP_01196427
73	ET023963	429	1080	putative signal peptide protein [ <i>Marinomonas</i> sp. MED121]	x	9E-42	59	ZP_01077543	
86	ET023964	331	1227	probable tartrate dehydrogenase/ 3-isopropylmalate dehydrogenase [ <i>Rhodococcus</i> sp. RHA1]	x	1E-18	60	YP_708005	
106	ET023966	255	2061	<b>vulnibactin outer membrane receptor precursor</b> [ <i>Vibrio vulnificus</i> ]	x	3E-15	56	AAF28471	
116	ET023967	322	1143	hypothetical protein VP1567 [ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633]	x	1E-06	68	NP_797946	
129	ET023968	344	-	Unknown COG	x	-	-	-	
130	ET023969	366	906	ferrous iron efflux protein F [ <i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar eltor str. N16961]	x	6E-44	76	NP_232318	
135	ET023970	219	1038	iSSod13, transposase [ <i>Vibrio vulnificus</i> YJ016]	x	1E-28	94	NP_934531	
154	ET023971	485	2058	ATPase involved in DNA repair-like protein [ <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400]	x	3E-41	70	YP_750769	
166	ET023972	375	-	Unknown COG	x	-	-	-	
173	ET023973	365	-	Unknown COG	x	-	-	-	
176	ET023974	347	3840	hypothetical protein CburD_01002029 [ <i>Coxiella burnetii</i> Dugway 7E9-12]	x	3E-12	45	ZP_01298115	
196	ET023975	389	1539	Phage integrase [ <i>Thiomicrospira crunogena</i> XCL-2]	x	1E-17	44	YP_390599	
197	ET023976	372	1038	iSSod13, transposase [ <i>Vibrio vulnificus</i> YJ016]	x	7E-67	95	NP_934531	
198	ET023977	336	8811	<b>RTX protein or Autotransporter adhesin</b> [ <i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6]	x	2E-072	42	NP_761533	
205	ET023978	450	894	glutamyl-tRNA synthetase [ <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472]	x	5E-31	50	NP_903103	
214	ET023979	355	5874	conserved hypothetical protein, putative DNA helicase [ <i>Desulfovibrio vulgaris subsp. vulgaris</i> DP4]	x	7E-11	48	ZP_01458409	
216	ET023980	480	2034	<b>Chain A, Chondroitinase Ac Lyase</b> [ <i>Flavobacterium heparinum</i> ]	x	7E-09	24	1CB8_A	
227	ET023981	414	498	GCN5-related N-acetyltransferase [ <i>Psychromonas ingrahamii</i> 37]	x	7E-21	57	ZP_01350703	
260	ET023982	432	1071	hypothetical protein P3TCK_08758 [ <i>Photobacterium profundum</i> 3TCK]	x	1E-05	89	P3TCK_08758	
269	ET023983	403	-	transposase, IS4 [ <i>Shewanella baltica</i> OS195]	x	8E-17	73	ZP_01432822	
273	ET023984	367	801	Unknown COG	x	-	-	-	
278	ET023985	369	951	ISPsy9, transposase OrfB [ <i>alpha</i> proteobacterium HTCC2255]	x	2E-33	68	ZP_01448232	
289	ET023986	449	1947	peptide ABC transporter, permease protein [ <i>Brucella abortus</i> biovar 1 str. 9-941]	x	2E-24	45	YP_223694	
293	ET023987	447	-	putative epimerase/dehydratase [ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633]	x	4E-77	96	NP_796614	
318	ET023988	506	1194	Unknown COG	x	-	-	-	
320	ET023989	281	1080	putative ABC transporter [ <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> ]	x	3E-22	33	BAA82537	
342	ET023990	383	510	Binding-protein-dependent transport systems inner membrane component [ <i>Psychromonas ingrahamii</i> 37]	x	5E-14	62	ZP_01350492	
348	ET023991	348	1530	hypothetical protein PBPRB0091 [ <i>Photobacterium profundum</i> SS9]	x	3E-40	62	YP_131764	
351	ET023992	365	801	deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase [ <i>Photobacterium profundum</i> SS9]	x	7E-32	60	YP_130718	
368	ET023993	517	1227	ISPsy9, transposase OrfB [ <i>alpha</i> proteobacterium HTCC2255]	x	2E-20	61	ZP_01449847	
376	ET023994	436	10947	2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit [ <i>Oceanocaulis alexandrii</i> HTCC2633]	x	6E-36	54	ZP_00953146	
384	ET023995	319	1164	alpha-aminoadipyl-L-cysteinyl-D-valine synthetase [ <i>Amycolatopsis lactamdurans</i> ]	x	6E-20	40	CAA40561	
417	ET023996	333	1143	nucleotide sugar dehydrogenase [ <i>Vibrio vulnificus</i> ]	x	6E-42	96	AAO32664	
424	ET023997	323	-	hypothetical protein VP1567 [ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633]	x	2E-07	37	NP_797946	
430	ET023998	372	-	Unknown COG	x	-	-	-	
431	ET023999	227	1155	Unknown COG	x	-	-	-	
439	ET024000	421	1056	putative acyl-CoA dehydrogenase [ <i>Oceanospirillum</i> sp. MED92]	x	4E-25	72	ZP_01165327	
458	ET024001	252	8361	putative ATP-binding ABC transporter [ <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841]	x	1E-30	47	CAK10505	
461	ET024002	284	2343	<b>meyA</b> [ <i>Microcystis aeruginosa</i> ]	x	1E-14	54	BAA83992	
476	ET024003	439	6348	organic solvent tolerance protein [ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633]	x	9E-37	72	BAC38602	
486	ET024004	481	1023	putative non-ribosomal peptide synthetase [ <i>Eirvinia carotovora subsp. atroseptica</i> SCR11043]	x	3E-22	44	YP_048600	
490	ET024005	444	-	<b>capsule biosynthesis protein capA</b> [ <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482]	x	4E-14	50	NP_810259	
505	ET024006	468	2022	Unknown COG	x	-	-	-	
507	ET024008	384	-	methyl-accepting chemotaxis protein [ <i>Cobwellia psychrerythraea</i> 34H]	x	3E-23	54	YP_270583	
526	ET024009	482	1035	Unknown COG	x	-	-	-	
541	ET024010	422	5835	PTS system N-acetylgalactosamine-specific IID component [ <i>Symbiobacterium thermophilum</i> IAM 14863]	x	3E-30	53	YP_075076	
553	ET024011	369	2157	unknown [ <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> ]	x	8E-33	51	AAK83337	
563	ET024012	374	1434	probable toxin transporter [ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	x	4E-38	66	AAO07530	
566	ET024013	404	942	Tn7-like transposition protein C [ <i>Shewanella baltica</i> OS155]	x	3E-34	60	ZP_00584340	
595	ET024014	395	2145	hypothetical protein OS145_02860 [ <i>Idiomarina baltica</i> OS145]	x	4E-13	52	ZP_01041994	
617	ET024015	191	-	type III restriction enzyme, res subunit [ <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400]	x	3E-32	65	YP_750771	
618	ET024016	230	888	Unknown COG	x	-	-	-	
622	ET024017	390	1124	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase [ <i>Marinomonas</i> sp. MED121]	x	6E-17	60	ZP_01075946	
				hypothetical protein V12B01_04853 [ <i>Vibrio splendidus</i> 12B01]	x	7E-32	79	ZP_0090364	

**Figure 1**

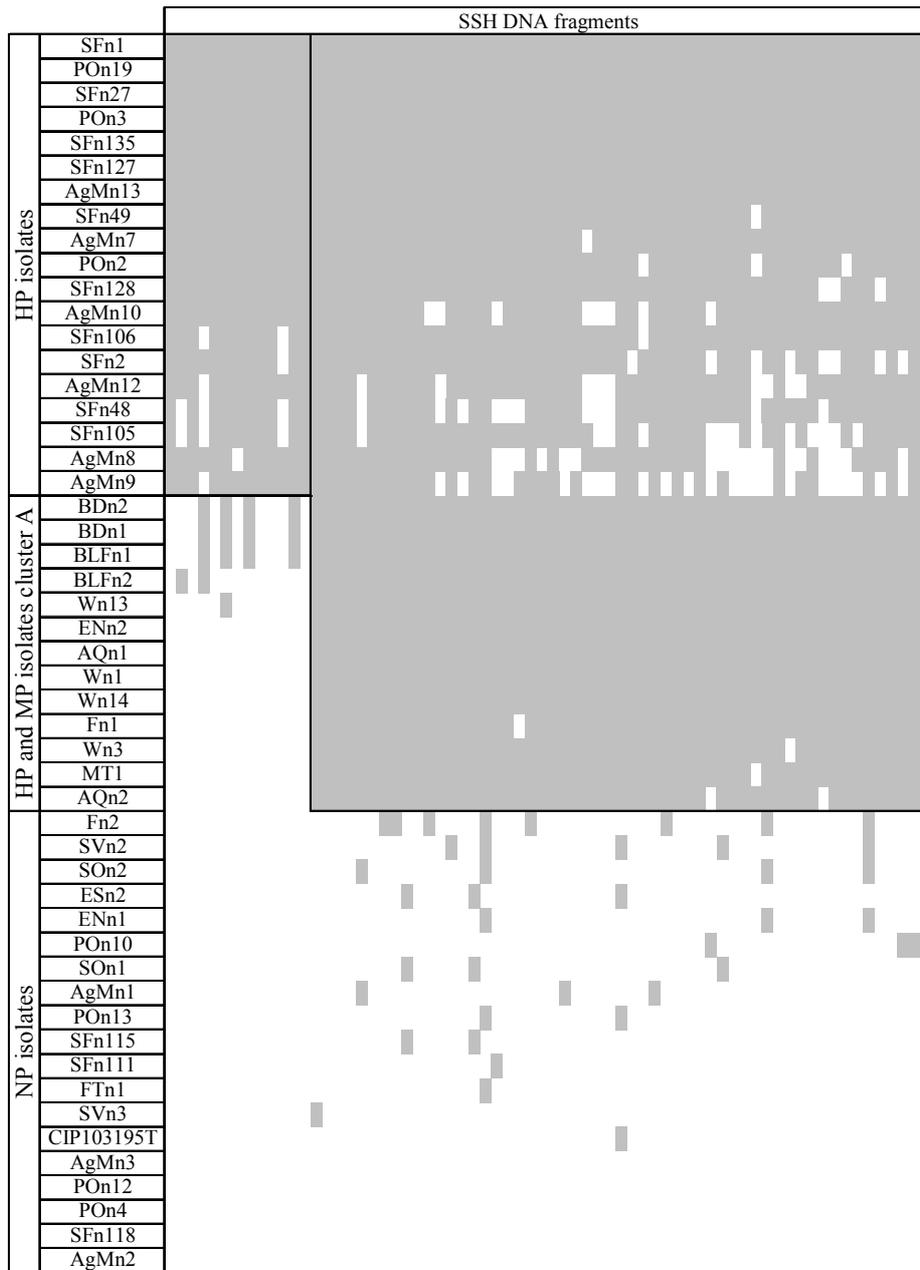
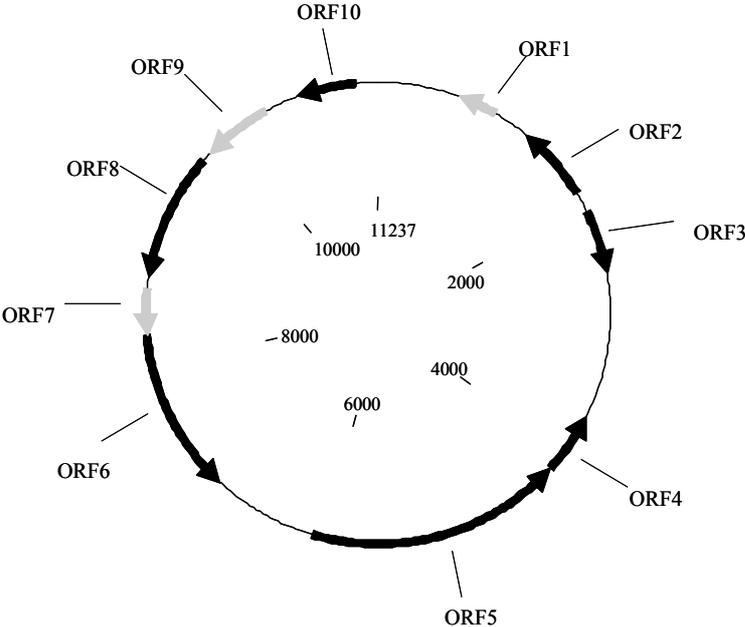
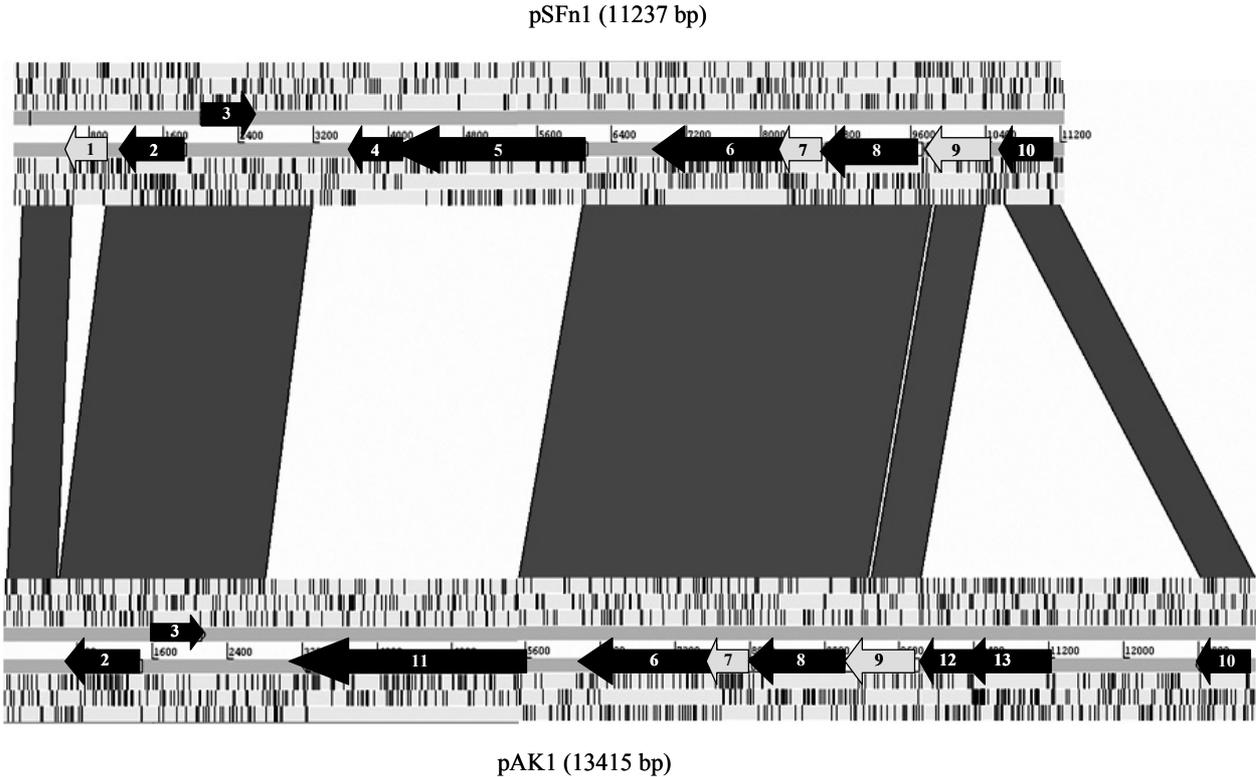


Figure 2

A



B





## **Annexe IV – Article 4**

Publié dans le journal de l'INRA : Productions Animales, en 2007

**« Emergence de maladies chez les organismes d'intérêt aquacole :  
quelques scénarios illustrés d'exemples »**

# Emergence de maladies chez les organismes d'intérêt aquacole : quelques scénarios illustrés d'exemples

D. SAULNIER, Y. REYNAUD, I. ARZUL, L. MIOSSEC, F. LE ROUX, C. GOARANT  
IFREMER, Génétique et Pathologie, F-17390 La Tremblade, France  
Courriel : dsaulnie@ifremer.fr

Selon l'Office International des Epizooties (OIE) une maladie émergente désigne une maladie grave récemment reconnue, dont la cause peut, ou non, avoir déjà été établie, et qui est susceptible de se propager au sein d'une population ou entre des populations, par exemple à l'occasion d'échanges internationaux d'animaux aquatiques et/ou de produits d'animaux aquatiques. Il peut s'agir d'une nouvelle maladie jamais rencontrée auparavant ou d'une maladie déjà connue s'exprimant différemment au regard de sa situation épidémiologique habituelle (incidence accrue, nouvelles espèces infectées, changement d'aire de répartition). On parle dans ce dernier cas de réémergence. En fait, il existe plusieurs définitions à la notion de maladie émergente qui se recoupent plus ou moins. Le dénominateur commun proposé par Toma et Thiry (2003) est une augmentation significative de l'incidence d'une maladie dans une population donnée, une région donnée et pendant une période donnée par rapport à la situation épidémiologique habituelle de cette maladie.

Les maladies émergentes d'origine virale qui affectent l'homme ont défrayé la chronique ces 70 dernières années : le virus West Nile (fièvre du Nil occidental) en 1937, le virus Ebola (fièvre hémorragique d'Ebola) en 1976, le virus de l'Immunodéficience Humaine (SIDA) en 1983, le coronavirus du SRAS (Syndrome Respiratoire Aigu Sévère) en 2003 et enfin le virus H5N1 (grippe aviaire) en 2004 pour ne citer que les plus connues médiatiquement. Ces maladies ont été très étudiées et ont bénéficié notamment des connaissances générées par la mise en place de réseaux de surveillance et l'évolution des techniques de diagnostic. En revanche celles qui affectent les organismes marins et même les espèces aquacoles d'intérêt économique sont beaucoup moins bien documentées.

L'une des raisons est le manque de données sur la situation épidémiologique habituelle des maladies sévissant en milieu marin en termes de prévalence, incidence et virulence notamment. Comme le souligne Harvell *et al* (1999), il est difficile dans ces conditions de conclure à l'émergence ou la réémergence d'une maladie suite à des épisodes de mortalités et de déterminer si cette mortalité traduit une transmission accrue du pathogène ou une moins grande résistance de l'hôte.

Le concept de maladies émergentes fait plus souvent référence dans son acception usuelle aux maladies transmissibles qu'aux maladies nutritionnelles, immunologiques ou métaboliques. C'est en restreignant l'émergence aux seules maladies infectieuses que seront présentés de façon non exhaustive quelques scénarios de l'émergence des maladies chez les organismes d'intérêt aquacole, en les illustrant par des exemples disponibles dans la littérature scientifique et d'autres provenant de l'expérience des auteurs.

## 1 / Apparition d'un agent pathogène chez un nouvel hôte : cas de l'herpesvirus de la carpe Koï (KHV)

Une nouvelle maladie responsable de mortalités massives chez la carpe commune et Koï (*Cyprinus carpio*) a été rapportée pour la première fois en mai 1998 dans une pisciculture israélienne, aux USA en août de la même année puis identifiée plus tard dans de nombreux pays d'Europe et d'Asie (Hedrick *et al* 2000, Haenen *et al* 2004). Des études morphologiques et phylogénétiques révèlent que l'agent étiologique appartient à la famille des *Herpesviridae* et que différents isolats d'origines géographiques différentes sont génétiquement identiques (Waltzek *et al* 2000). La

mortalité peut atteindre 80 à 100 % au sein des populations infectées et survient 6 à 24 jours post infection (Dishon *et al* 2005). Elle est préférentiellement observée lorsque la température de l'eau est de 17°C-26°C (Haenen *et al* 2004). La transmission du virus de poisson infecté à indemne s'effectue *via* l'eau d'élevage, les fèces ou le sédiment et est favorisée par le confinement des animaux dans un volume d'eau restreint (Dishon *et al* 2005). Dans la mesure où l'élevage de la carpe est une activité multiséculaire demandant beaucoup d'attention, il apparaît davantage probable que cet agent infectieux n'ait infecté que très récemment cette espèce de poisson (hôte naïf) plutôt que cette maladie soit passée inaperçue avant 1998 (Thiéry *et al* 2003). L'origine de cet herpesvirus n'est pas connue. A ce jour aucune espèce autre que *C. carpio* n'a été trouvée porteuse de ce virus ce qui peut s'expliquer par le fait que les techniques de diagnostic sensibles telles l'amplification en chaîne par la polymérase (PCR) et la PCR quantitative sont d'utilisation récente (Gilad *et al* 2004).

L'émergence de la maladie et sa large distribution géographique depuis son apparition en Israël s'expliquent en grande partie par les transferts de poissons de zones infectées vers les zones indemnes. Elle fait partie aujourd'hui de la liste des maladies à déclaration obligatoire notifiée par l'OIE.

## 2 / Evolution d'un agent pathogène existant : cas de la vibriose à *Vibrio nigripulchritudo* dans les élevages de crevettes pénéides néocalédoniens

Depuis 1998 une mortalité massive de crevettes *Litopenaeus stylirostris* est rencontrée de façon saisonnière dans

une ferme de Nouvelle-Calédonie. Elle s'exprime sous la forme de brèves flambées épizootiques durant la saison chaude et est désignée sous le vocable de syndrome d'été. Les premiers morts apparaissent dans chaque élevage après environ 55 jours d'élevage dans tous les bassins de cette ferme et les survies finales sont de l'ordre de 25 % au lieu d'être supérieures à 50 % en l'absence de syndrome d'été (Rapport DESANS 2006). Plusieurs suivis épidémiologiques réalisés sur cette ferme et dans différents compartiments de l'élevage ont permis de montrer que la quasi-totalité des crevettes moribondes présentaient une vibriose septicémique à *Vibrio nigripulchritudo* considéré depuis comme l'agent étiologique de cette maladie (Goarant *et al* 2004, 2006a). Cette espèce bactérienne a été décrite pour la première fois par Baumann *et al* (1971) à partir d'échantillons d'eau océanique effectués au large des îles Hawaï. En 2002, le syndrome d'été s'est étendu à une nouvelle ferme néo-calédonienne, proche de celle déjà affectée, faisant craindre un risque d'extension de cette maladie aux 15 autres fermes non affectées par cette pathologie à ce jour.

Contrairement au syndrome d'été, une autre pathologie, nommée syndrome 93, survient de façon saisonnière en hiver et affecte ou a affecté la totalité des fermes néo-calédoniennes (Mermoud *et al* 1998). En effet, la majorité des éleveurs ne réalise plus aujourd'hui qu'un élevage par an au lieu de deux, durant la saison chaude, ce changement de pratiques zootechniques permettant de diminuer fortement l'incidence du syndrome 93. L'agent étiologique du syndrome d'hiver est *Vibrio penaeicida* (Costa *et al* 1998, Goarant *et al* 1999, Saulnier *et al* 2000). Dans quelques cas, des souches appartenant à l'espèce *V. nigripulchritudo* ont été également isolées au cours d'épisodes de Syndrome 93 (Costa *et al* 1998, Goarant *et al* 1999).

Depuis l'apparition de ces deux pathologies, des suivis bactériologiques réguliers ont été effectués et de nombreuses souches de *V. nigripulchritudo* d'origine clinique ou environnementale ont été isolées entre 1995 et 2003, réparties dans 13 fermes et 3 éclosiers de Nouvelle-Calédonie, dans un contexte de présence ou non du syndrome d'été. Le pouvoir pathogène des souches a été évalué par infection expérimentale révélant l'existence de souches non virulentes, virulentes et d'autres exprimant une virulence

intermédiaire (Goarant *et al* 2006a). Ces souches aux statuts de virulence différents coexistent quelquefois sur une même ferme pénécicole simultanément. Le génotypage d'une collection de 58 souches *V. nigripulchritudo* révèle que toutes les souches associées au syndrome d'été sont génétiquement très proches (quasiment clonales) et distinctes des souches de *V. nigripulchritudo* isolées dans d'autres contextes épidémiologiques (Goarant *et al* 2006b). Ceci a permis de mettre au point un outil diagnostique ciblant spécifiquement le groupe émergent (Goarant *et al* 2007).

Une approche moléculaire a été entreprise à partir de deux souches de *V. nigripulchritudo* très proches génétiquement et isolées d'une même ferme affectée par le syndrome d'été visant à identifier des marqueurs génétiques de la virulence des souches *V. nigripulchritudo*. Une technique de soustraction génomique (SSH) a été employée en utilisant une souche fortement virulente en infection expérimentale (SFn1) et une autre dénuée de pathogénicité (SFn118) (Reynaud *et al* 2005). Les fragments d'ADN identifiés (plus de 600), spécifiques de SFn1, ont ensuite été utilisés comme sondes pour étudier leur présence chez d'autres souches de *V. nigripulchritudo* présentant un statut de virulence variable, en utilisant une technique d'hybridation ADN/ADN ou macroarray. Treize sondes se révèlent être spécifiques de souches virulentes (soit 22 souches sur les 58 étudiées).

Par ailleurs, un plasmide d'environ 11 kpb a été identifié, après purification, chez la souche SFn1. Les autres souches virulentes testées portent également un plasmide identique à celui de SFn1 après analyse des profils de restriction puis d'hybridation obtenus par *southern blot* en utilisant une des sondes froides spécifiques de souches virulentes. Cette sonde correspond à un fragment d'ADN de SFn1 présentant plus de 90 % de similitude au niveau de sa séquence nucléotidique avec une séquence, dénommée Z2Z3 disponible dans GenBank. Celle-ci code pour une protéase putative et a été mise en évidence dans le plasmide de *V. shilonii*, un vibron associé au blanchiment du corail (Kushmaro *et al* 2001). Le séquençage complet du plasmide de SFn1 a permis de révéler qu'au moins 10 fragments d'ADN spécifiques de souches virulentes parmi les 13 préalablement identifiés, dont Z2Z3, sont portés par ce support plasmidique.

La combinaison des résultats relatifs au statut de virulence des souches, aux profils d'hybridation en macroarray avec des sondes spécifiques de la souche virulente (SFn1) et à l'identification de plasmides, indiquent que des marqueurs génétiques du statut de virulence ont été identifiés avec succès et que les marqueurs génétiques spécifiques de souches virulentes sont pour l'essentiel à support plasmidique. Ces résultats suggèrent en outre fortement que l'acquisition d'un plasmide par des souches de *V. nigripulchritudo*, qui en étaient dénuées, a conféré un pouvoir pathogène accru à ces souches. En plus de cette évolution probable, la similitude d'un fragment de séquence du plasmide avec celle d'un autre vibron affectant une autre espèce marine (Z2Z3 de *V. shilonii*), suggère la possibilité d'un transfert inter-espèce d'un ou plusieurs facteurs de virulence *via* ces plasmides ce qui n'est pas sans conséquence d'un point de vue épidémiologique.

De façon similaire, la virulence de *Vibrio anguillarum* est en partie due à l'existence d'un plasmide, pJM1, codant des gènes impliqués dans la biosynthèse et le transport de sidérophore (Crosa 1980). Il a pu être montré chez d'autres espèces de *Vibrio*, celui responsable du choléra en particulier, que l'acquisition de structures génétiques mobiles autres que des plasmides conférerait une virulence accrue aux *Vibrio* «naïfs». Tous les *Vibrio cholerae* ne sont pas pathogènes pour l'homme. Pour le devenir, le vibron doit notamment acquérir la capacité à produire la toxine cholérique responsable des diarrhées mortelles du choléra. Celle-ci est transmise à la bactérie par un bactériophage, CTX, dont le génome s'intègre au chromosome bactérien et dont l'un des gènes code la toxine cholérique (Val *et al* 2005). Un autre exemple est celui de *Vibrio harveyi* fréquemment associé à des épisodes de mortalité en élevage larvaire de crevettes. Des souches naïves infectées par un bactériophage (VHML) ont une virulence accrue en infection expérimentale, attribuée en partie à une augmentation de la sécrétion d'hémolysines (Munro *et al* 2003).

### 3 / Introduction d'un pathogène préexistant, exotique : le cas de *Bonamia ostreae*

*Bonamia ostreae* est un protiste parasite affilié à la famille des haplosporidies responsable d'épisodes de mortalité chez les huîtres plates *Ostrea edulis*.

Ainsi, du fait de l'apparition du parasite *Marteilia refringens* dans les années 1968-1970 suivie 10 ans plus tard par *B. ostreae*, la production annuelle française d'huîtres plates est passée de 15 à 20 000 tonnes (années 60) à 2500 tonnes (années 80) pour stagner autour de cette valeur jusqu'à aujourd'hui. Détectée pour la première fois en France chez des huîtres plates de l'île Tudy (Bretagne), à la fin des années 70 (Pichot *et al* 1979, Comps *et al* 1980), la bonamiose s'est répandue dans la quasi-totalité des parcs ostréicoles bretons dès 1981 (Tigé *et al* 1981) ainsi que dans les gisements naturels et est aujourd'hui présente dans de nombreux pays européens dont l'Espagne, l'Angleterre, l'Irlande, le Danemark et les Pays-Bas (Balouet 1983, Bucke et Feist 1985, van Banning 1987, McArdle *et al* 1991, Montes *et al* 1991). La transmission du parasite d'huîtres infectées à huîtres naïves est directe (Elston *et al* 1987). Aussi est-il vraisemblable que la répartition géographique actuelle de la maladie s'explique par l'intensité et la fréquence des transferts internationaux d'huîtres plates vivantes de zones infectées par *B. ostreae* vers des zones indemnes. Ce parasite est également rencontré outre-atlantique, sur la côte ouest des États-Unis (Katskansky *et al* 1969) ainsi que depuis peu, en 2004, au Canada (Rapport annuel de l'Agence Canadienne d'Inspection des Aliments 2005). L'apparition de *B. ostreae* en France coïncide avec l'importation de naissains d'huîtres plates *O. edulis* en provenance de Californie à la fin des années 70. En effet, il est communément admis (Elston 1989) que ces huîtres étaient affectées par la bonamiose suite aux observations de Katskansky *et al* (1969) et Katskansky et Warner (1974) décrivant un parasite présentant une morphologie identique à celle de *B. ostreae*. La mortalité rapportée en France a révélé la maladie qui est aujourd'hui notifiée par l'OIE dans la liste des maladies à déclaration obligatoire.

Les origines d'introduction de pathogènes exotiques les plus souvent suspectées sont de nature anthropique du fait notamment des échanges commerciaux d'animaux infectés vivants (cas de la bonamiose) ou du trafic maritime. Pour illustrer ce dernier cas, le «*fouling*» sur les coques des navires ou le déversement des eaux de ballast des navires marchands représentent un risque d'introduction majeur de pathogènes exotiques. Même non vivants, des organismes infectés destinés par exemple à la consommation ou à la pêche (comme appâts), et congelés dans le cas suivant, peuvent véhiculer des agents pathogènes demeurant infectieux. C'est le cas par exemple du virus «*WSSV, White Spot Syndrome Virus*» responsable de la maladie des points blancs chez les crevettes pénéides (Durant *et al* 2000, Hasson *et al* 2006) qui est considérée comme la maladie induisant les plus grosses pertes économiques en crevetticulture au niveau mondial (Flegel et Fegan 2002). Les risques d'introduction anthropique du WSSV dans des zones indemnes sont d'autant plus importants que ce virus peut infecter plus de 50 espèces de crustacés d'eau douce ou marins (Flegel et Fegan 2002).

## Conclusion

Les causes d'émergence de maladies sont multiples et font intervenir de façon intercurrente, le plus souvent à l'occasion d'une rupture écologique :

- l'agent pathogène *via* le processus de mutation, l'acquisition de nouveaux facteurs de virulence, les capacités de transmission et de multiplication de l'agent infectieux,
- l'environnement *via* le dérèglement d'un écosystème : changement d'un paramètre biotique ou abiotique du milieu favorable à un agent infectieux, phénomène de réchauffement climatique,

- l'hôte ou les espèces hôtes : affaiblissement des capacités de défense, hôte naïf vis-à-vis d'un pathogène, arrivée ou prolifération d'hôtes réservoirs, transfert de pathogènes entre espèces élevées et les espèces sauvages du milieu naturel,

- des facteurs anthropiques : transfert d'espèces d'intérêt aquacole, pratiques d'élevage (telles l'intensification), sur-exploitation, fragilisation du milieu (pollution).

L'impact écologique des maladies émergentes rencontrées dans le milieu marin, et à fortiori celles imputables à des agents infectieux, est largement méconnue en raison d'informations parcellaires sur l'épidémiologie des maladies, de l'énorme biodiversité observée dans le monde marin et enfin de la complexité des écosystèmes au regard de celles prévalant en milieu terrestre. Les critères permettant de caractériser classiquement une maladie émergente que sont l'augmentation de l'incidence, de la prévalence et de la virulence des agents pathogènes (transmissibilité, expression de facteurs de virulence) se heurtent en milieu marin à l'absence de données, pour une pathologie donnée, permettant de caractériser une situation épidémiologique «normale» ou standard soumise éventuellement à des fluctuations saisonnières. Face à ce constat, il apparaît essentiel de se doter de réseaux de surveillance des maladies portant non seulement sur les espèces d'élevage mais également celles, sauvages, du milieu naturel qui puissent fédérer plusieurs spécialités (écologie, physiologie, pathologie et épidémiologie notamment). De même, un effort de recherche important doit être consacré au développement d'outils diagnostiques opérationnels facilitant cette surveillance afin de détecter le plus précocement possible une maladie émergente, d'en suivre l'évolution à l'aide d'outils pertinents et d'envisager des moyens de lutte adaptés permettant d'en limiter les effets.

## Références

- Balouet G., Poder M., Cahour A., 1983. Haemocytic parasitosis: morphology and pathology of lesions in the French flat oyster, *Ostrea edulis* L. *Aquaculture*, 34, 1-14.
- Baumann P., Baumann L., Mandel M., 1971. Taxonomy of marine bacteria: *Beneckeia nigrapulchrituda* sp. n. *J. Bacteriol.*, 107, 268-294.
- Bucke D., Feist S., 1985. Bonamiasis in the flat oyster, *Ostrea edulis*, with comments on histological techniques. In: Ellis A.E. (Ed), *Fish and shellfish pathology*. Academic Press, London, UK, 387-392.
- Comps L., Tigé G., Grizel H., 1980. Etude ultrastructurale d'un Protiste parasite de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *C.R. Acad. Sci.*, sér. D, 290, 383-384.
- Costa R., Mermoud I., Koblavi S., Morlet B., Haffner P., Berthe F., Legroumellec M., Grimont P., 1998. Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (syndrome 93) in

- New-Caledonia. Aquaculture, 164 (1-4), 297-309.
- Crosa J.H., 1980. A plasmid associated with virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* specifies an iron-sequestering system. Nature, 284, 566-568.
- Dishon A., Perelberg A., Bishara-Shieban J., Ilouze M., Davidovich M., Werker S., Kotler M., 2005. Detection of Carp Interstitial Nephritis and Gill Necrosis Virus in fish droppings. Appl. Env. Microbiol., 71 (11), 7285-7291.
- Durand S.V., Tang K.F., Lightner D.V., 2000. Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of white spot syndrome virus and yellow head virus. J. Aquat. Anim. Health, 12, 128-135.
- Elston R.A., 1989. Status and future of molluscan pathology in North America. Advances in Tropical Aquaculture. Tahiti, Feb. 20 - March 4, 1989. AQUACOP. IFREMER. Actes de Colloque, 189-198.
- Elston R.A., Kent M.L., Wilkinson M.T., 1987. Resistance of *Ostrea edulis* to *Bonamia ostreae* infection. Aquaculture, 64, 237-242.
- Flegel T.W., Fegan D.F., 2002. Strategies for preventing the spread of fish and shellfish diseases. Fish Sci., 68 (Suppl 1), 776-788.
- Gilad O., Yun S., Zagmutt-Vergara F., Leutenegger C.M., Bercovier H., Hedrick R.P., 2004. Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio koi* as assessed by real-time TaqMan PCR. Dis. Aquat. Org., 60 (3), 179-187.
- Goarant C., Merien F., Berthe F., Mermoud I., Perolat P., 1999. Arbitrarily primed PCR to type *Vibrio* spp. pathogenic for shrimp. Appl. Environ. Microbiol., 65, 1145-1151.
- Goarant C., Herlin J., Ansquer D., Imbert F., Domalain D., Marteau A.L., 2004. Épidémiologie de *Vibrio nigripulchritudo* dans le cadre du Syndrome d'été : résultats préliminaires du programme DESANS. In : Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Nouméa-Koné, 2-6 juin 2003. IFREMER (Ed.), Actes de Colloque, 38, 210-215.
- Goarant C., Ansquer D., Herlin J., Domalain D., Imbert F., De Decker S., 2006a. «Summer Syndrome» in *Litopenaeus stylirostris* in New-Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. Aquaculture, 253 (1-4), 105-113.
- Goarant C., Reynaud Y., Ansquer D., Decker S.D., Saulnier D., Le Roux F., 2006b. Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New-Caledonia Syst. Appl. Microbiol., 29 (7), 570-580.
- Goarant C., Reynaud Y., Ansquer D., de Decker S., Merien F., 2007. Sequence-polymorphism-based identification and quantification of *Vibrio nigripulchritudo* at the species and sub-species level targeting an emerging pathogen for cultured shrimp in New Caledonia. J. Microbiol. Methods, 70, 30-38.
- Haenen O.L.M., Way K., Bergmann S.M., Ariel E., 2004. The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 24 (6), 293-307.
- Harvell C.D., Kim K., Burkholder J.M., Colwell R.R., Epstein P.R., Grimes D.J., Hofmann E.E., Lipp E.K., Osterhaus A.D.M.E., Overstreet R.M., Porter J.W., Smith G.W., Vasta G.R., 1999. Emerging marine diseases - climate links and anthropogenic factors. Science, 285, 1505-1510.
- Hasson K.W., Fan Y., Reisinger T., Venuti J., Varner P.W., 2006. White-spot syndrome virus (WSSV) introduction into the Gulf of Mexico and Texas freshwater systems through imported, frozen bait-shrimp. Dis. Aquat. Org., 71, 91-100.
- Hedrick R.P., Gilad O., Yun S., Spangenberg J.V., Marty G.D., Nordhausen R.W., Kebus M.J., Bercovier H., Eldar A., 2000. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. J. Aquat. Anim. Health, 12, 44-57.
- Katkansky S.C., Warner R.W., 1974. Pacific oyster disease and mortality studies in California. State of California, Resources Agency, Department of Fish and Game, Sacramento, Marin. Res. Techn. Rep., 25, 51p.
- Katkansky S.C., Dahlstrom W.A., Warner R.W., 1969. Observations on survival and growth of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in California. Calif. Fish Game, 55 (1), 69-74.
- Kushmaro A., Banin E., Loya Y., Stackebrandt E., Rosenberg E., 2001. *Vibrio shiloi* sp. nov.: the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 5, 1383-1388.
- McArdle J.F., McKiernan F., Foley H., Jones D.H., 1991. The current status of *Bonamia* disease in Ireland. Aquaculture, 93, 273-278.
- Mermoud I., Costa R., Ferre O., Goarant C., Haffner P., 1998. «Syndrome 93» in New-Caledonian outdoor rearing ponds of *Penaeus stylirostris* : history and description of three major outbreaks. Aquaculture, 164 (1-4), 323-335.
- Montes J., Villalba A., Lopez M.C., Carballal M.J., Mourelle S.G., 1991. Bonamiasis in native flat oysters (*Ostrea edulis* L.) from two intertidal beds of the Ortigueira estuary (Galicia, NW Spain) with different histories of oyster culture. Aquaculture, 93, 213-224.
- Munro J., Oakey J., Bromage E., Owens L., 2003. Experimental bacteriophage-mediated virulence in strains of *Vibrio harveyi*. Dis. Aquat. Organ., 54, 187-194.
- Pichot Y., Comps M., Tige G., Grizel H., Rabouin R., 1979. Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. Rev. Travaux Institut des Pêches Maritimes, 43 (1), 131-140.
- Rapport annuel de l'Agence Canadienne d'inspection des Aliments, 2005. <http://www.inspection.gc.ca/francais/anima/surv/2005oief.shtml>
- Rapport DESANS, 2002-2006. <http://www.ifremer.fr/ncal/publications/documents/rapport-DESANS-NC-25-9.pdf>
- Reynaud Y., Le Roux F., Saulnier D., Goarant C., 2005. Searching for genetic markers of virulence in *Vibrio nigripulchritudo*, a *Litopenaeus stylirostris* shrimp pathogen isolated in New-Caledonia. Vibrio 2005, Ghent, Belgique 6-8 Nov. 2005, 115-116
- Saulnier D., Avarre J.C., Le Moullac G., Ansquer D., Levy P., Vonau V., 2000. Rapid and sensitive PCR detection of *Vibrio penaeicida*, the putative etiological agent of syndrome 93 in New-Caledonia. Dis. Aquat. Organ., 40 (2), 109-115.
- Thiéry R., Pozet F., de Kinkelin P., 2003. Deux maladies virales émergentes chez les poissons : la nodaviruse des espèces marines et l'herpesviruse de la carpe koi, *Cyprinus carpio*. Epidémiol. Santé Anim., 44, 83-94.
- Tigé G., Grizel H., Martin A.G., Langlade A., Rabouin M.A., 1981. Situation épidémiologique consécutive à la présence du parasite *Bonamia ostreae* en Bretagne. Evolution au cours de l'année 1980. Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches Marit., 315, 13-20.
- Toma B., Thiry E., 2003. Qu'est-ce qu'une maladie émergente ? Epidemiol. Santé Anim., 44, 1-11.
- Val M.E., Bouvier M., Campos J., Sherratt D., Cornet F., Mazel D., Barre F.X., 2005. The single-stranded genome of phage CTX is the form used for integration into the genome of *Vibrio cholerae*. Mol. Cell, 19, 1-8.
- van Banning P., 1985. Control of *Bonamia* in Dutch oyster culture. In: Ellis A.E. (Ed), Fish and shellfish pathology. Academic Press, London, UK, 393-396.
- Waltzek T.B., Kelley G.O., Stone D.M., Way K., Hanson L., Fukuda H., Hirono I., Aoki T., Davison A.J., Hedrick R.P., 2005. Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family *Herpesviridae*. J. Gen. Virol., 86, 1659-1667.

## Résumé

Selon l'Office International des Epizooties (OIE) une maladie émergente désigne une maladie grave récemment reconnue, dont la cause peut, ou non, avoir déjà été établie, et qui est susceptible de se propager au sein d'une population ou entre des populations, par exemple à l'occasion d'échanges internationaux d'animaux aquatiques et/ou de produits d'animaux aquatiques. Si les maladies émergentes qui affectent la santé humaine ont été très étudiées, celles qui touchent les organismes marins et les organismes aquacoles d'intérêt économique en particulier sont en revanche peu documentées. C'est en restreignant l'émergence aux seules maladies infectieuses que seront présentés de façon non exhaustive quelques scénarios de l'émergence des maladies chez les organismes d'intérêt aquacole en les illustrant par trois exemples disponibles dans la littérature scientifique : l'un relatif à l'apparition d'un agent pathogène chez un nouvel hôte avec le cas de l'herpesvirus de la carpe Koi, l'autre à l'évolution d'un agent pathogène existant avec le cas de la vibriose à *Vibrio nigripulchritudo* sévissant dans les élevages de crevettes pénaïdes de Nouvelle-Calédonie et enfin le dernier lié à l'introduction d'un pathogène préexistant avec le cas de *Bonamia ostreae* infectant l'huître plate *Ostrea edulis*. Les causes d'émergence de maladies sont mul-

tiples et font intervenir de façon intercurrente l'agent pathogène, l'environnement, l'hôte ou les espèces hôtes et des facteurs anthropiques. Dans le milieu marin, ces causes sont bien souvent méconnues. Dans ce contexte le développement des réseaux de surveillance et des techniques de diagnostic revêtent un intérêt considérable afin d'anticiper, de prévenir et/ou d'intervenir sur l'émergence des maladies en limitant leur conséquences sanitaires, écologiques et politiques.

## Abstract

---

### *Emerging diseases in organisms of aquaculture interest: some scenarios illustrated with examples*

According to the world organisation for animal health (OIE) an emerging disease is defined as a recently admitted serious illness, whose aetiology can, or not, have already been established, and which is likely to be propagated within a population or between populations, for example at the time of international exchanges of aquatic animals and/or products of aquatic animals. Even though the emerging diseases that affect human health have been much studied, those which affect marine organisms and species of aquaculture interest in particular are poorly documented. By restricting emergence to only infectious diseases, we aim at presenting in a non-exhaustive way some scenarios of the emergence of the diseases of aquacultured species by illustrating them with three examples available in the scientific literature: one relating to the appearance of a pathogenic agent in a new host with the case of the herpesvirus of the Koï carp, the other with the evolution of a pre-existing pathogenic agent with the case of shrimp vibriosis due to *Vibrio nigripulchritudo* in New Caledonia, and the last example relating to the introduction of one pathogenic pre-existing pathogen in an unscathed area with the case of *Bonamia ostreae* infecting the flat oyster *Ostrea edulis*. The causes of the emergence of diseases are multiple and implicate in an intercurrent way pathogenic agents, the environment, the host or host species and anthropogenic factors. In the marine environment, these causes are very often ignored. In this context, the development of zoosanitary surveillance networks and diagnostic tools present a considerable interest in order to anticipate, prevent and/or intervene on the emergence of the diseases by limiting their sanitary, ecological and political consequences.

SAULNIER D., REYNAUD Y., ARZUL I., MIOSSEC L., LE ROUX F., GOARANT C., 2007. Emergence de maladies chez les organismes d'intérêt aquacole : quelques scénarios illustrés d'exemples. INRA Prod. Anim., 20, 207-212.







## Identification de marqueurs génétiques de la virulence chez *Vibrio nigripulchritudo*, un pathogène de crevettes péneïdes en Nouvelle-Calédonie

### Résumé

Depuis 1997, les élevages de crevettes en Nouvelle-Calédonie sont confrontés à une nouvelle maladie, le Syndrome d'été, une vibriose septicémique dont l'agent étiologique est *Vibrio nigripulchritudo*. Les résultats d'infection expérimentale sur une collection de souches, ont montré l'existence de trois pathotypes distincts : hautement (HP), moyennement (MP) et non pathogène (NP). L'étude du polymorphisme génétique de 58 souches par typage moléculaire en MLST et AP-PCR, a mis en évidence un groupe phylogénétique particulier caractérisé par un très faible degré de variabilité génétique (confirmant l'émergence de ce groupe en parallèle à l'émergence du Syndrome d'été) et constitué uniquement de souches HP (dont toutes celles associées au Syndrome d'été) et de souches MP. Afin d'identifier des marqueurs génétiques de la virulence des souches responsables du Syndrome d'été, et parmi ces marqueurs des gènes codant potentiellement pour des effecteurs de la virulence, une approche soustractive par SSH a été développée entre une souche HP de type Syndrome d'été et une souche NP : 368 marqueurs génétiques ont ainsi été mis en évidence ; la distribution de ces marqueurs a été étudiée chez les 58 souches de la collection par une approche en macroarray : 78 marqueurs ont été sélectionnés, qui permettent de caractériser les différents groupes phylogénétiques et les différents pathotypes, dont 13 fragments spécifiques des souches HP type Syndrome d'été. Parmi ces 13 fragments, 10 ont été localisés sur le plasmide pSFn1 qui a été entièrement séquencé. Ce même plasmide a été purifié uniquement des souches HP de type Syndrome d'été. Par ailleurs, une très forte homologie a été mise en évidence entre pSFn1 et pAK1, un autre plasmide également séquencé et retrouvé chez la souche *V. shilonii* AK1, responsable du blanchiment du corail *Oculina patagonica* en Méditerranée. Ces résultats ont ouvert la discussion sur le rôle de pSFn1 dans la virulence de *V. nigripulchritudo*.

**Mots clés :** *Vibrio nigripulchritudo*, vibriose, crevette, virulence, épidémiologie, SSH, plasmide.

## Identification of genetic markers of virulence in *Vibrio nigripulchritudo*, a penaeid shrimp pathogen in New-Caledonia

### Abstract

Since 1997, a new pathology seasonally occurs in new caledonian shrimp farms during the warm season and was named Summer Syndrome. Diseased *Litopenaeus stylirostris* shrimp suffer from a septicemic vibriosis which was attributed to *V. nigripulchritudo*. Preliminary studies based on a collection of *V. nigripulchritudo* strains have brought to light different virulence levels according to experimental infections results; three virulence statuses were defined: highly (HP), moderately (MP) and non pathogenic (NP). The aim of this work was to genetically characterize virulent *V. nigripulchritudo* strains. In a first step the genetic diversity of 58 *V. nigripulchritudo* strains was analyzed by MLST and AP-PCR, revealing a cluster of HP and MP strains, characterized by a low genetic variability and that includes all Summer Syndrome-associated isolates. This confirms the emergence of one cluster of pathogenic *V. nigripulchritudo* simultaneously with the emergence of the Summer Syndrome ; in a second step, 368 genetic markers of virulence were identified by a Suppressive Subtractive Hybridization performed between the genomes of a HP strain and a genetically close, NP isolate; the distribution of the screened SSH fragments was studied in 58 *V. nigripulchritudo* isolates by macro-array: 78 DNA fragments were selected, allowing to characterize clusters identified and pathogenic statuses; 13 are specific of the HP strains involved in Summer Syndrome. Interestingly, 10 of these markers are carried by a plasmid pSFn1 that contains sequences highly similar to those of a plasmid pAK1, detected in *Vibrio shilonii*, a coral pathogen. The origin and consequences of this plasmid acquisition are discussed.

**Key words:** *Vibrio nigripulchritudo*, vibriosis, shrimp, virulence, epidemiology, SSH, plasmid.