

Objet :
Détection de la bactérie *Vibrio*
tubiashii chez des huîtres creuses et
des ormeaux en France

Direction Générale de l'Alimentation
Bureau de la Santé Animale

75732 PARIS CEDEX 15

Dossier suivi par :
Céline Garcia
Agnès Travers
Cyrille François
Tristan Renault

La Tremblade, le 19/03/2014

Référence : 14-007 LGP/PAT/LNR/CG/AG/CF/TR/SL

Madame,

Le Laboratoire de Génétique et de Pathologie des Mollusques Marins tient à vous informer de la détection chez des huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, ainsi que chez des ormeaux, *Haliotis tuberculata*, de bactéries identifiées comme appartenant à l'espèce *Vibrio tubiashii*.

La caractérisation a été réalisée *a posteriori* sur différents échantillons d'huîtres creuses et un lot d'ormeaux prélevés pour hausse de mortalité entre 2004 et 2008. L'identification de certaines souches bactériennes isolées lors de hausse de mortalité et n'appartenant ni à l'espèce *V. aestuarianus* ni à l'espèce *V. splendidus* nécessite un travail sur le long terme. De plus, la diversité génétique des bactéries appartenant à l'espèce *V. tubiashii* fait encore l'objet de recherche.

Vibrio tubiashii n'est pas un agent réglementé, mais a été incriminé dans des mortalités d'huîtres creuses sur la côte ouest des Etats-Unis.

Vous trouverez ci-après l'origine des différents échantillons pour lesquels la bactérie a été détectée et les résultats des différentes analyses réalisées sur ces échantillons. D'autre part, des analyses ont été également effectuées sur des échantillons collectés lors d'épisodes de mortalité massive d'huîtres creuses observés en 2008, 2009, 2011 et 2012 et ont permis de montrer une absence de détection de la bactérie.

Siège social
155, rue Jean-Jacques Rousseau
92138 Issy-les-Moulineaux Cedex
France
R.C.S. Nanterre B 330 715 368
APE 731 Z
SIRET 330 715 368 00297
TVA FR 46 330 715 368

téléphone 33 (0)1 46 48 21 00
télécopie 33 (0)1 46 48 22 96
<http://www.ifremer.fr>

1. Caractérisation de souches bactériennes comme appartenant à l'espèce *Vibrio tubiashii* dans des échantillons d'huîtres creuses collectés en 2007

Pour différents lots d'huîtres creuses prélevés lors de hausse de mortalité en 2007, des broyats de tissus de manteau et branchies ou des prélèvements d'hémolymphe ont fait l'objet de mise en culture sur milieu Marine agar.

Des souches bactériennes majoritaires ont été isolées et analysées dans un premier temps par PCR en temps réel multiplex afin de savoir si elles appartenaient à l'espèce bactérienne *Vibrio aestuariamus* ou au groupe bactérien *V. splendidus*. Pour ces différentes souches isolées, aucune amplification n'a été observée en PCR en temps réel signifiant que ces souches n'appartenaient ni à l'espèce *V. aestuariamus* ni au groupe *V. splendidus*.

Dans un second temps, afin de caractériser certaines des souches isolées, le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16s a été réalisé. Les résultats obtenus identifiaient certaines souches comme appartenant à l'espèce *V. mytilii* (groupe *V. harveyi*). Des analyses complémentaires réalisées en 2011 et 2012 sur ces souches ont permis de préciser leur identification et de mettre en évidence qu'elles étaient proches de l'espèce *V. tubiashii*.

Afin de confirmer l'appartenance des souches isolées à l'espèce *V. tubiashii*, une approche polyphasique basée sur des critères biochimiques et génétiques a été réalisée. Dans cette approche, les souches isolées ont été comparées avec différentes souches bactériennes phylogénétiquement proches (*V. tubiashii*, *V. hepatarius*, *V. brasiliensis*, *V. mediterranei*, *V. nereis*, *V. xuii*, *V. harveyi* et *V. coralliilyticus*) sur la base de critères biochimiques (galeries API, culture sur milieux chromogéniques, températures tolérées, salinités tolérées, sensibilité aux antibiotiques). Des hybridations de génomes complets (ou hybridation ADN/ADN) ont également été réalisées.

Les résultats obtenus ont permis de confirmer que certaines souches isolées lors de prélèvements réalisés 2007 lors de hausses de mortalité d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* appartenaient à l'espèce *V. tubiashii*. Des bactéries identifiées comme appartenant à l'espèce *V. tubiashii* ont ainsi été détectées en 2007 dans 14 lots d'huîtres creuses correspondant à des animaux prélevés dans trois écloséries dont celle de l'Ifremer La Tremblade.

2. Caractérisation du pouvoir pathogène des souches de *Vibrio tubiashii* isolées

Le pouvoir pathogène des souches isolées a été exploré au travers d'essais d'infection expérimentale chez les huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, au laboratoire.

Ces bactéries sont capables d'induire des mortalités sur du naissain ou des adultes d'huîtres creuses : une injection intra-musculaire de 5.10^7 bactéries/animal a permis d'induire 90 à 100% de mortalité en 24h. Elles se sont aussi montrées virulentes au stade larvaire : la DL50 (dose létale induisant 50% de mortalité) a été déterminée à environ 10^3 bactéries/ml sur des larves de 13 jours.

3. Recherche de *Vibrio tubiashii* sur différents lots d'huîtres creuses ou d'ormeaux par PCR en temps réel

Suite à la détection de *V. tubiashii* dans différents lots d'huîtres collectés en 2007, la bactérie a été recherchée à l'aide d'un outil de PCR en temps réel sur des lots provenant d'épisode de mortalité issus du milieu naturel et également sur d'autres lots issus d'écloserie. En effet, un outil de détection spécifique (PCR en temps réel ciblant un gène codant pour une métalloprotéase) a été développé et utilisé pour **analyser 50 lots à mortalité issus d'écloseries françaises (22 lots collectés entre 2004 et 2011) ou issus du milieu naturel (28 lots collectés en 2008 et 2012).**

Seulement trois de ces 50 lots analysés (représentant 384 échantillons) ont présenté des résultats positifs, indiquant la présence d'ADN de bactéries identifiées comme *V. tubiashii* : un lot d'ormeaux collecté en 2004 (écloserie) et deux lots d'huîtres creuses collectés en 2008 (dans deux écloseries différentes). Les résultats obtenus pour les différents lots analysés sont présentés dans le Tableau 1. **L'ensemble des résultats d'analyses réalisées sur les lots collectés lors d'épisodes de mortalité en milieu naturel (naissain, juvéniles ou adultes) s'est révélé négatif.** Ces résultats ont été confirmés par un deuxième outil diagnostique plus général (gène *gyrB*) permettant d'identifier toutes les bactéries de l'espèce *V. tubiashii*.

En conclusion, des souches bactériennes identifiées comme appartenant à l'espèce *Vibrio tubiashii* ont été isolées sur différents lots d'huîtres creuses et un lot d'ormeaux prélevés pour hausse de mortalité dans des écloseries françaises entre 2004 et 2008. Ces souches peuvent être responsables des mortalités observées sur les échantillons d'huîtres creuses prélevées.

Tous les résultats d'analyses réalisées sur les lots collectés lors d'épisodes de mortalité en milieu naturel (naissain, juvéniles ou adultes) en 2008, 2009, 2011 et 2012 se sont révélés négatifs.

Nous restons à votre disposition et vous prions d'agréer, Madame, Monsieur, l'expression de nos meilleures salutations.

Sylvie Lapègue
Responsable du Laboratoire LGPMM

Copies : DGA1 – DDPP 29
Ifremer