

Eric lazaille

Licence professionnelle
Techniques et applications en biologie cellulaire et moléculaire
Université Victor Ségalen Bordeaux II

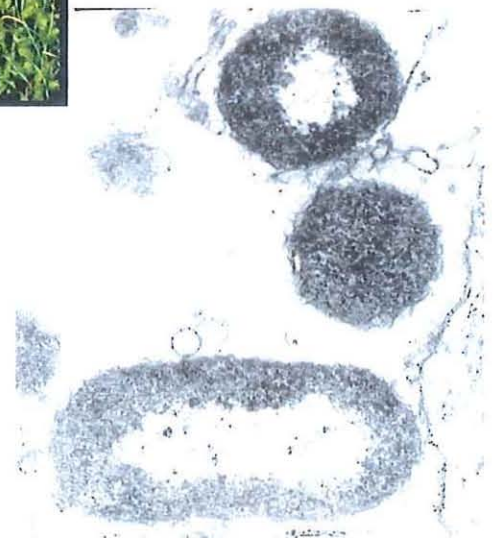
2040.
E700-LA2.T
04/1967

Stage effectué au LGP du 8 janvier au 30 juin 2003
Laboratoire de génétique et pathologie
IFREMER, 17390 La Tremblade

Responsable scientifique:
Frédérique Le Roux

Taxonomie et virulence de *Vibrio* pathogènes de *Crassostrea gigas*

IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADE



REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord Mr Philippe Gouletquer de m'avoir accueilli au sein de la station de La Tremblade et pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Je remercie aussi Frédérique Le Roux, responsable du stage, de m'avoir soutenu, aidé encouragé et surtout supporté tout au long de mon stage. Elle m'a permis d'appréhender ce qu'était réellement le monde de la recherche et ses implications. Son aide fût inestimable tout au long de ce stage.

Je remercie Mélanie Gay pour ses conseils judicieux et son aide précieuse durant le stage et pour l'écriture de ce rapport.

Je remercie aussi l'ensemble du personnel que cela soit les cadres, Denis, Tristan, Franck, Isa, Céline, Tim, Raphaël et tous les autres, pour leur conseils leur aide et leur joie de vivre.

Les techniciens Maéva, Bruno, Nicole, Serge, Jean-Côme, Stéphane et tous les autres pour leur aide et leur patience.

Les doctorants et stagiaires Lionel, Valérie, Nicolas, Delphine, Sarah, Emilie, Béatrice, Karine, Gaëlle et tous les autres pour tous les moments que l'on a partagés.

Merci encore à tous pour tout ce que vous m'avez apporté, autant scientifiquement que personnellement durant ce stage.

SOMMAIRE

1	INTRODUCTION	5
2	MATÉRIELS ET MÉTHODES	8
2.1	HUÎTRES	8
2.2	BACTÉRIES.....	8
2.2.1	<i>Préparation des solutions bactériennes pour injection</i>	8
2.2.2	<i>Préparation des produits extracellulaires pour injection</i>	8
2.3	INFECTION EXPÉRIMENTALE	9
2.3.1	<i>Injection</i>	9
2.3.2	<i>Implant de billes</i>	9
2.4	TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE.....	10
2.4.1	<i>Polymérisation en chaîne</i>	10
2.4.1.1	Extraction d'ADN	10
2.4.1.2	Réaction en chaîne de polymérisation (PCR).....	11
2.4.2	<i>Séquencage</i>	12
2.4.2.1	Purification des produits PCR.....	12
2.4.2.2	Réaction de séquence.....	13
2.4.3	<i>Biochimie des protéines</i>	15
2.4.3.1	Etude des protéines totales.....	15
2.4.3.1.1	Gel.....	15
2.4.3.1.2	Coloration :	16
2.4.3.2	Etude des protéases par zymographie	16
2.4.3.2.1	Renaturation	16
2.4.3.2.2	Coloration	16
2.5	TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE.....	17
2.5.1	<i>Histopathologie</i>	17
2.5.2	<i>Cytométrie</i>	17
2.5.2.1	Préparation des échantillons.....	18
2.5.2.2	Etude de la mortalité	18
2.5.2.3	Etude de la phagocytose.....	19
3	RÉSULTATS.....	20
3.1	IDENTIFICATION	20
3.1.1	<i>Caractérisation moléculaire</i>	20
3.1.1.1	Gène codant pour l'ARN 16S	20
3.1.1.2	Gène GyrB.....	20
3.2	ÉTUDE DE LA VIRULENCE DES SOUCHES ET DÉVELOPPEMENT DE NOUVELLES APPROCHES.	20
3.2.1	<i>Etude de la virulence par découplage du groupe J</i>	21
3.2.2	<i>Développement de nouvelles pathologies expérimentales</i>	21
3.2.2.1	Muscle (couramment pratiqué).....	21
3.2.2.2	Cœur	21
3.2.2.3	Billes.....	22
3.3	ÉTUDE DES POSSIBLES FACTEURS DE VIRULENCE.....	22
3.3.1	<i>Essai d'injection d'ECP (graphique 4)</i>	22
3.3.2	<i>Etude des protéines totales issues d'ECP</i>	23
3.3.3	<i>Zymogramme sur protéines issues d'ECP</i>	23
3.4	ÉTUDES DES LÉSIONS INDUITES PAR LES BACTÉRIES	23
3.4.1	<i>Etude de la pathologie</i>	23
3.4.1.1	Description générale des lésions	23
3.4.1.2	Description des lésions provoquées par les témoins sur des huîtres moribondes.....	24

3.4.1.2.1	Injection musculaire	24
3.4.1.2.2	Implant de billes	24
3.4.1.3	Description des lésions provoquées par Mel 39 seule sur des huîtres moribondes (annexe 1).....	24
3.4.1.3.1	Injection musculaire	24
3.4.1.3.2	Implant de billes	24
3.4.1.4	Description des lésions provoquées par Mel 40 seule sur des huîtres moribondes (annexe 1).....	25
3.4.1.4.1	Injection musculaire	25
3.4.1.4.2	Implant de billes	25
3.4.1.5	Description des lésions provoquées par la coculture 39/40 sur des huîtres moribondes (annexe 1).....	25
3.4.1.5.1	Injection musculaire	25
3.4.1.5.2	Implant de billes	25
3.4.2	<i>Etude des hémocytes</i>	26
3.4.2.1	Cytométrie en flux	26
3.4.2.1.1	Etude de la mortalité hémocytaire	26
3.4.2.1.2	Etude de la phagocytose	26
4	DISCUSSION.....	28
5	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	32
6	BIBLIOGRAPHIE.....	34
7	ANNEXES.....	36

Abréviations

ADN	: Acide désoxiribonucleique
APS	: Ammonium persulfate
BET	: Bromure d'éthidium
CFU	: Colonies formant unités
D.O	: densité optique
ddNTP	: Didesoxyribonucléotide
dNTP	: désoxyribonucléotide
ECP	: Extra cellular products (produits extracellulaires bactériens)
EDTA	: Ethylene dianine tetraacetic acid
EMS	: eau de mer stérile
FS	: Forward scattered
IP	: Iodure de propidium
PCR	: Polymerase chain reaction
SDS	: Dodecyl sulfate de sodium
SS	: Side scattered
TAE	: Tris acetate EDTA (Tris acetate 0.04M, 1 mM EDTA pH8)
TE	: Tris 10 mM EDTA 1mM pH8
Tris	: Hydroxymethyl aminomethane

1 Introduction

La filière conchylicole, première activité aquacole de France, est confrontée depuis plusieurs années à un phénomène de mortalité estivale. Ces mortalités sont rencontrées aussi bien en écloserie qu'en site naturel et s'expriment sous la forme de brèves flambées de mortalité touchant généralement le naissain avec des taux de mortalités pouvant atteindre 100 %. [1,2,5]

De nombreuses études ont montrées que l'étiologie de ce phénomène est complexe et multifactorielle avec des composantes environnementales telles que les facteurs physico-chimiques du milieu, des composantes propres à l'hôte (physiologie, génétique) et des agents infectieux. [1]

On connaît aujourd'hui une grande variété d'agents infectieux chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, des protozoaires, des ciliés, des virus ou des bactéries. Ces agents sont considérés comme opportunistes c'est à dire que leur action peut dépendre de la sensibilité de l'hôte et leur virulence de l'environnement.

Les *Vibrio* semblent être les bactéries les plus impliquées dans les mortalités d'espèces d'intérêt aquacole et depuis 1997 une étude sur les *vibrios* associées aux épisodes de mortalités estivales de naissain d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* a été entreprise au laboratoire de génétique et pathologie (LGP) de La Tremblade. [2,6,7]

Lors de l'été 2001, des expériences de cohabitation entre des huîtres saines d'écloserie et des huîtres subissant un épisode de mortalité estivale ont été réalisées. Dans le cas où une transmission de la mortalité a été observée la flore Vibrionaceae a été isolée de l'hémolymphe d'huîtres moribondes initialement saine. 125 souches ont ainsi été isolées.

La virulence de ces différents souches a été étudiée par infection expérimentale qui consiste en une injection dans le muscle adducteur de l'huître juvénile. Du fait du grand nombre de souches étudiées elles ont été regroupées par groupe de trois ou quatre suivant l'épisode de mortalité. Cinq groupes de souches sur 31 entraînent de fortes mortalités. [10]

Une caractérisation phénotypique de ces souches a démontré l'appartenance de la majorité des souches au groupe polyphylétique des *Vibrio splendidus*.

Le découplage d'un groupe de souches (groupe H) en pathologie expérimentale a révélé un phénomène tout à fait original : deux souches (Mel 31 et Mel 32) collaborent pour tuer l'hôte.

Ces souches ont été sélectionnées pour l'étude de la pathogénèse : altérations de l'hôte, réponse immunitaire et mécanismes de virulence de ces bactéries.

Le principal objectif de ce travail est l'étude d'un autre groupe de bactéries, le groupe J ; comportant les bactéries Mel 38, Mel 39 et Mel 40 .

Dans un premier temps nous avons caractérisé les bactéries du groupe J au niveau taxonomique par des méthodes moléculaires.

En effet, les outils biochimiques à notre disposition ne sont plus adaptés pour identifier les espèces de *Vibrio* marins. Les clés d'identification biochimiques d'Alsina et Blanch [9] sont dépassées car elles n'incluent pas la vingtaine d'espèces identifiées depuis 2 ans. Nous avons donc abordé l'identification des bactéries du groupe J par des outils de biologie moléculaire et notamment le séquençage de gène d'intérêt phylogénétique.

L'appartenance d'une souche à une espèce donnée est définie par un % d'hybridation ADN/ADN supérieur à 70% entre la souche et la souche de

référence de l'espèce donnée. Or c'est une méthode longue, fastidieuse et qui nécessite l'emploi de radioactivité.

L'étude en phylogénie moléculaire du gène 16S est aussi couramment réalisée pour identifier une souche bactérienne.

Cependant, dans le cas des *Vibrios splendidus*, le gène 16S ne présente souvent pas assez de polymorphisme pour discriminer certaines espèces trop proches (3% de variabilité du polymorphisme alors que c'est aussi le pourcentage d'erreur intrinsèque lors d'un séquençage).

De plus, il est présent en plusieurs copies dans le génome et le polymorphisme inter copies, au sein du même génome, peut être aussi important que le polymorphisme entre espèces chez *Vibrio splendidus*.

Depuis peu le laboratoire propose l'étude phylogénétique du gène GyrB comme alternative aux hybridations ADN/ADN pour la caractérisation d'espèces de *Vibrios*.

Le gène GyrB, qui code pour une gyrase (topoisomérase), a une vitesse d'évolution plus rapide ce qui permet une meilleure discrimination entre espèces proches, il n'est présent qu'en une seule copie dans le génome, et ne se transmet pas horizontalement.

La seconde partie de ce travail a consisté à évaluer la virulence de ces souches en infections expérimentales en injectant le groupe de trois souches puis les souches individuelles.

Enfin nous avons entamé la caractérisation du mode d'action de ces souches par une étude des possibles facteurs de virulence des bactéries [8], une description histopathologique des lésions sur l'huître et une analyse en cytométrie en flux des altérations cellulaires. [5]

2 Matériel et méthode

2.1 Huîtres

Les huîtres utilisées en infection expérimentale proviennent de captage naturel de naissain. Ces huîtres sont âgées de 12 à 18 mois et mesurent entre 2 et 8 cm. A leur arrivées elles sont acclimatées en température pour atteindre 20°C avant leur utilisation en infection expérimentale.

2.2 Bactéries

2.2.1 Préparation des solutions bactériennes pour injection

Les bactéries sont cultivées 24h dans du zobell liquide (milieu marine agar liquide). Pour obtenir une coculture de plusieurs souches, on mélange les cultures des différentes bactéries (V/V). A 48h on mesure la densité optique (DO) à 540 nm et on en déduit la concentration en bactéries, sachant que pour ces bactéries une DO de 1 correspond environ à une concentration de 10^9 CFU/mL. Quatre mL de culture sont centrifugés 30 min à 2000 g, le surnageant est éliminé et le culot repris par un volume d'eau de mer artificielle stérile (5 mL) de façon à obtenir une concentration de 8.10^8 CFU /ml.

2.2.2 Préparation des produits extracellulaires pour injection

Pour recueillir la production extracellulaire de bactéries, une membrane stérile de cellophane est déposée sur une boîte de tryptic soy agar et recouverte par 1 à 2 ml de culture bactérienne de 24 h en eau peptonée.

Après 24 h d'incubation la membrane est retirée et rincée par du PBS 1000 mOsM.

L'ensemble est centrifugé 30 min à 10 000 g à 4°C. Le surnageant est filtré à 0.22 µm sur un filtre ne retenant pas les protéines pour éliminer les bactéries résiduelles. On normalise la concentration pour l'injection en utilisant un kit basé sur la méthode de Bradford. On stocke ensuite les échantillons à -20°C. [4]

2.3 Infection expérimentale

Les huîtres sont préalablement paralysées en position ouverte par un bain thermostaté à 20 °C de 3h d'une solution de MgCl₂ à 50 g/l additionné de nourriture (phytoplancton). Le MgCl₂ agit au niveau du muscle en empêchant sa contraction.(annexe 4)

2.3.1 Injection

On injecte 50µl d'une solution bactérienne à 8.10⁸ CFU/mL (soit 4.10⁷ CFU) ou de produits extra cellulaires bactériens ECP (5µg), soit dans le muscle adducteur de l'huître soit dans la cavité péricardique. Les résultats sont généralement analysés en tenant compte de la mortalité cumulée des trois premiers jours.

2.3.2 Implant de billes

Les billes sont placées dans une solution bactérienne à DO =1 sous agitation pendant 24 h. La bille est bloquée derrière le muscle d'une huître anesthésiée. Les mortalités cumulées sont analysées 5 jours après injection.

Chaque lot comporte 30 huîtres qui, après injection ou greffe, sont immédiatement placées en condition statique dans un aquarium avec de l'eau de mer filtrée à 1µm, un bullage et une alimentation quotidiens. Chaque condition testée est réalisée en triplicat. Les huîtres moribondes sont prélevées et comptabilisées au moins une fois par jour.

2.4 Techniques de biologie moléculaire

2.4.1 Polymérisation en chaîne

2.4.1.1 Extraction d'ADN

Les bactéries sont étalées sur du milieu solide marine agar et mises à incuber une nuit. Le lendemain, les bactéries sont prélevées à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée, et déposées dans 1 mL de solution de lyse: protéinase K 200 µg/ml (permet une dénaturation des protéines et donc une meilleure dissociation de l'ADN et des protéines associées), SDS 0.5% (détergent qui permet une déstructuration de la membrane), EDTA pH 8 25 mM (agent chélateur de cation inhibant ainsi les DNase ayant comme cofacteur des cations) et Tris pH 8 10 mM, NaCl 100 mM (tamponnent le milieu). Le mélange est incubé 1 nuit à 55°C.

Le lendemain, on ajoute 1 mL Phénol/chloroforme-alcool isoamylique (V/V_{24:1}) et on agite 1 min.

La différence d'affinité des différents constituants pour les deux phases permet de séparer les débris et protéines, qui ont plus d'affinité pour la phase phénolique, de l'ADN qui a une plus forte affinité pour la phase aqueuse.

L'ensemble est centrifugé 10 min à 9000 g, on récupère 500 µL de la phase aqueuse sans prélever l'interphase blanchâtre, où se trouvent les protéines, et on y ajoute 50 µL d'acétate de sodium 3 M pH 5.4 (1/10V) pour la déshydratation, on mélange et on ajoute 1.25 mL d'éthanol 100% (2.5V) pour la précipitation.

L'ensemble est mélangé doucement et centrifugé 10 min à 9000 g, le surnageant est éliminé et le culot repris par 1 ml d'éthanol 70 % permettant l'élimination de l'excès de sels dans les 30 % d'eau (lavage).

Le mélange est centrifugé 10 min à 9000 g, le surnageant est éliminé. Le culot est séché et repris par 100 µL de TE (Tris-HCl pH 7.5 10 mM, EDTA 1 mM) additionné de 1 µL de RNase à 10 mg/ml.

On détermine la pureté des ADN par le rapport entre la DO à 260 nm et la DO à 280 nm qui doit être le plus proche possible de 1,7. On détermine la concentration des ADN à 260 nm (une DO de 1 correspondant à 50 µg/mL). Les ADN sont conservés à une concentration de 500 ng/µl à 4°C.

2.4.1.2 Réaction en chaîne de polymérisation (PCR)

La PCR, ou "polymérase chain reaction", est une technique d'amplification par une ADN polymérase thermorésistante, d'une partie spécifique d'ADN à partir d'oligonucléotides spécifiques encadrant le fragment à amplifier. Les brins d'ADN sont dénaturés, les oligonucléotides se fixent spécifiquement sur la cible et deviennent ainsi des amorces pour l'ADN polymérase qui synthétise spécifiquement les fragments complémentaires.(annexe 3)

Mix réactionnel pour un échantillon:		Pour Y échantillons.
Tampon de l'enzyme 10X	5 µl	Yx5 µL
MgCl ₂ 25 mM	5 µL	Yx5 µL
dNTP 20 mM	0.5 µL	Yx0.5 µL
Primers sens 100 µM	0.5 µL	Yx0.5 µL
Primers anti sens 100 µM	0.5 µL	Yx0.5 µL
Taq DNA polymérase 5 U/µL	0.5 µL	Yx0.5 µL
H ₂ O qsp 49 µL	37 µL	Yx37 µL

On ajoute 1 µL d'ADN à 500 ng/µL correspondant pour chaque échantillon

Programme pour une amplification du gène codant pour la gyrase :

Dénaturation de l'ADN 94°C	3 min	
Dénaturation de l'ADN 94°C	1 min	} 35 Cycles
Etape d'hybridation 58°C	1 min	
Etape d'élongation 72°C	2 min	
Etape d'élongation finale 72°C	10 min	

Pour une amplification du gène codant pour la petite sous unité ribosomale 16S, le programme est identique sauf pour la température d'hybridation qui est de 50°C.

Les produits obtenus sont analysés par migration électrophorétique sur un gel d'agarose à 1% (1 gr d'agarose/100 mL de TAE + 5 µL de bromure d'éthidium BET qui est un agent intercalant de l'ADN permettant de le visualiser sous UV).(annexe 2)

2.4.2 Séquencage

2.4.2.1 Purification des produits PCR

Les bandes obtenues après la migration sur gel d'agarose sont découpées sous UV et conservées dans des tubes Eppendorf. La purification est réalisée grâce au kit Qiaex II Gel extraction kit (Qiagen).

Les morceaux d'agarose sont incubés 10 min à 50°C avec 500 µL de tampon QX1, qui sert à dissoudre l'agarose et de 10 µL de billes Qiaex II, servant à récupérer l'ADN, en vortexant toutes les trois minutes. Les tubes sont centrifugés 1 min à 9000 g, le surnageant est éliminé et remplacé par 500 µL de tampon QX1, pour éliminer les traces d'agarose encore présentes. Après les avoir vortexés, les tubes sont centrifugés 1 min à 9000 g le surnageant est éliminé et le culot repris par 500 µL de tampon PE (lavage). L'ensemble est

vortexé, centrifugé 1 min à 9000 g et le surnageant est éliminé. Cette opération se fait par deux fois et le culot résultant est séché à l'air environ 30 min. Le culot est repris par 20 µL d'eau, pour l'élution de l'ADN, puis vortexé et centrifugé 5 min à 9000 g. Cinq microlitres de surnageant, contenant l'ADN purifié, est contrôlé sur un gel d'agarose à 1%, le reste est stocké à -20°C.

2.4.2.2 Réaction de séquence

Pour le séquençage, on utilise le kit d'Epicentre SequiTherm Excell II. Cette réaction repose sur une réaction de polymérisation en chaîne mais où l'on incorpore des ddNTP dans le mix réactionnel qui lorsqu'ils se fixent pendant l'étape d'élongation arrêtent cette étape. La présence dans le mix réactionnel de ddNTP et de dNTP fait qu'en probabilité, lors d'un cycle, un ddNTP peut de fixer n'importe quand lors de l'étape d'élongation à la place d'un dNTP et ainsi arrêter l'étape d'élongation n'importe quand. De ce fait des fragments de toutes les tailles possible sont générés. En considérant le nombre de matrices toutes les longueurs possibles du fragment sont statistiquement représentées.

Pour que le séquenceur puisse les visualiser les amorces sont marquées par des fluorochrome émettant à 800 nm pour l'amorce sens et à 700 nm pour l'amorce anti-sens.

Pour 1 réaction:		Pour Y réactions :
Tampon de l'enzyme 3.5X (contenant le MgCl ₂ et les dNTP)	7.2 µL	Y X 7.2 µL
Primers sens marqué 10 pmol/µL	0.2 µL	Y X 0.2 µL
Primers anti sens marqué 10 pmol/µL	0.2 µL	Y X 0.2 µL
Excell II DNA polymérase 5U/µL	1 µL	Y X 1 µL
H ₂ O qsp 10 µL	1.4 µL	Y X 1.4 µL

A ce pré-mix on rajoute 10 μL d'ADN purifié (environ 500ng/ μL). Ce pré-mix est réparti en 4 puits auxquels on ajoute un didésoxynucléotide différent ddATP, ddGTP, ddCTP ou ddTTP qui arrête la réaction lorsqu'ils se fixent.

Programme du cycle de réaction:

Dénaturation de L'ADN	92°C	2 min	} 30 Cycles
Dénaturation de L'ADN	92°C	30 sec	
Etape d'hybridation	58°C	30 sec	
Etape d'élongation	70°C	1 min	

A la fin de la réaction on ajoute 3 μL de solution stop (c'est un tampon de dépôt) qui sert à arrêter la réaction et aussi à maintenir les ADN simple brin lors de la dénaturation de 3 min à 95°C avant le séquençage.

La migration se fait sur un gel de polyacrylamide à 5.5% dénaturant, car contenant de l'urée, dans un séquenceur Li-cor DNA de science tec.

La lecture des séquences et surtout leur correction se fait grâce au logiciel d'exploitation du séquenceur.

L'analyse et l'alignement des séquences se fait grâce à des logiciels de bioinformatique, inversion, complémentation et traduction chez infobiogen (<http://www.infobiogen.fr/>) alignement des séquences deux à deux et recherche de séquences sur le site du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Les alignements multiples sont réalisés à partir de *clustal W* sur le site du NCBI et les arbres phylogénétiques sont réalisés à partir de PhyloWIN un logiciel développé par Manolo Gouy à l'université de Lyon.

2.4.3 Biochimie des protéines

2.4.3.1 Etude des protéines totales

Les échantillons sont au préalable chauffés trois min à 95°C pour dénaturer les protéines. La séparation des protéines totales s'effectue en gel dénaturant de polyacrilamide/SDS.

2.4.3.1.1 Gel

Le gel est composé de deux parties:

Le gel de résolution à 12 % :

Aussi appelé running gel, il permet la séparation des protéines. Il est coulé en premier et forme donc la partie basse du gel.

Lower tris 4X 2.5 mL, acryl/bisacrylamide 30 % 4 mL, H₂O 3.4 mL, Temed 20 µL, APS 10 % 120 µL.

Le gel de concentration :

Aussi appelé stacking gel, il permet la concentration des dépôts avant qu'ils ne pénètrent dans le gel de résolution. Il est coulé en second et constitue donc la partie supérieure du gel.

Upper tris 4X 1 mL, Acryl/bisacrylamide 30 % 666 µL H₂O 3 mL, Temed 10 µL, APS 10% 60 µL.

Le SDS confère aux protéines une charge globale négative ce qui les pousse à migrer différemment vers le pôle positif, uniquement selon leur taille respective. C'est aussi un détergent qui permet de dénaturer, de façon réversible les protéines.

Les échantillons sont déposés avec du bleu de charge contenant du β-mercaptoéthanol qui, par rupture des ponts disulfures, maintiendra, de façon permanente, les protéines sous forme dénaturée.

2.4.3.1.2 Coloration :

Le gel est démoulé et coloré par un bain de 30 min de bleu de coomassie (1g de bleu brillant dissout dans 500 mL d'alcool à 95°C, 100 mL d'acide acétique et 400 mL d'eau distillée) puis décoloré par un bain d'environ 1h d'une solution de décoloration (100 mL d'acide acétique, 350 mL de méthanol H₂O qsp 2L). Le gel est ensuite déposé sur une feuille de papier puis séché 1h à 80°C sous vide, pour pouvoir le conserver. L'ensemble du gel se décolore sauf là où il y a des protéines qui fixent le colorant.

2.4.3.2 Etude des protéases par zymographie

Pour visualiser une activité enzymatique il faut que les protéines puissent se renaturer, pour cela on n'ajoute pas de β-mercaptoéthanol au bleu de charge. De plus on incorpore 500 µL de gélatine à 2 % au gel de résolution pour servir de substrat aux probables protéases.

2.4.3.2.1 Renaturation

Le gel est démoulé et mis à incuber pour une renaturation *in situ* dans du triton X100 à 2.5 % pendant 2h en changeant le tampon régulièrement. Puis le gel est mis à incuber dans un tampon d'incubation. Le tampon d'incubation, permettant la réaction de protéolyse *in situ* est changé et le gel est laissé à incuber pendant 1 nuit à 37°C.

2.4.3.2.2 Coloration

La coloration se fait de la même manière que pour le gel de protéines totales. Ici une bande plus ou moins blanche correspond à une protéase.

2.5 Techniques de biologie cellulaire

2.5.1 Histopathologie

Les huîtres issues d'infection expérimentale sont fixées en Davidson (1.2 L d'eau de mer, 1.2 L d'alcool à 95°, 300 mL de formaldéhyde à 38 %, 400 ml de glycérol et 310 mL d'acide acétique cristallisable) de 24 h à plusieurs jours à 4°C. Elles sont ensuite imprégnées de paraffine par un automate LKB puis sont incluses pour faire des blocs. Des coupes de 2 µm sont réalisées dans ces blocs de paraffine, grâce à un microtome LKB et sont ensuite fixées à la lame par une nuit à 60°C.

Le déparaffinage des coupes se fait par deux bains de xylène de 30 min, la réhydratation par un bain de 15 min dans de l'alcool absolu puis un bain de 15 min d'alcool à 95°, vient ensuite un lavage à l'eau courante pendant 5 min.

La coloration se fait par un bain d'hémalum durant 1 min 30, vient ensuite un rinçage à l'eau courante 5 min puis une contre coloration par un bain d'éosine de 3 min 30. Les coupes sont ensuite déshydratées par deux bains d'alcool à 95° de 1 min puis par un bain d'alcool absolu de 1 min. Deux bains de xylène permettent d'éliminer toute trace d'alcool car il est non miscible à la colle utilisée pour monter les lamelles (Eukitt).

L'hématoxyline colore les noyaux en bleu violet foncé et les structures acidophiles, telles que les fibres musculaires, sont colorées en rose par l'éosine. Les cytoplasmes restent gris. L'observation se fait au microscope photonique.

2.5.2 Cytométrie

Le cytomètre de flux est un appareil permettant une analyse multiparamétrique de cellules, de compartiments cellulaires ou d'activités cellulaires. Les cellules

sont contenues dans un flux liquidien constant qui est fractionné pour pouvoir étudier séparément chaque cellule. Grâce à la longueur d'onde de 488 nm émise par le laser, les fluorochromes potentiellement présents sont excités et réémettent des signaux captés et traduits pour être analysés. Dans le cas des analyses effectuées, ce cytomètre analyse la taille des cellules (FS) grâce à la déviation du laser aux petits angles, la complexité cellulaire (SS) grâce à la déviation aux grands angles et il analyse la possible émission de fluorescence par les fluorochromes.

2.5.2.1 Préparation des échantillons

24h après l'injection de bactéries, cinq huîtres vivantes par condition sont prélevées. Leur hémolymphe est ponctionnée, poolée et filtrée à 60 µm sur de la glace pour éliminer le plus de débris possible.

La concentration hémocytaire est ajustée à 100 000 cellules /100 µL en diluant avec de l'eau de mer artificielle stérile.

Chaque expérience de mesure de la mortalité et de la phagocytose est réalisée 24h et 48h après l'injection.

2.5.2.2 Etude de la mortalité

10 µL d'iodure de propidium (IP) à 1 mg/mL sont ajoutés à 200 µL d'hémolymphe. Le mélange est incubé à 4°C à l'obscurité pendant 30 min avant le passage au cytomètre. L'IP émet à 617 nm et la longueur d'onde est recueillie sur le canal FL3 par le filtre 600-650.

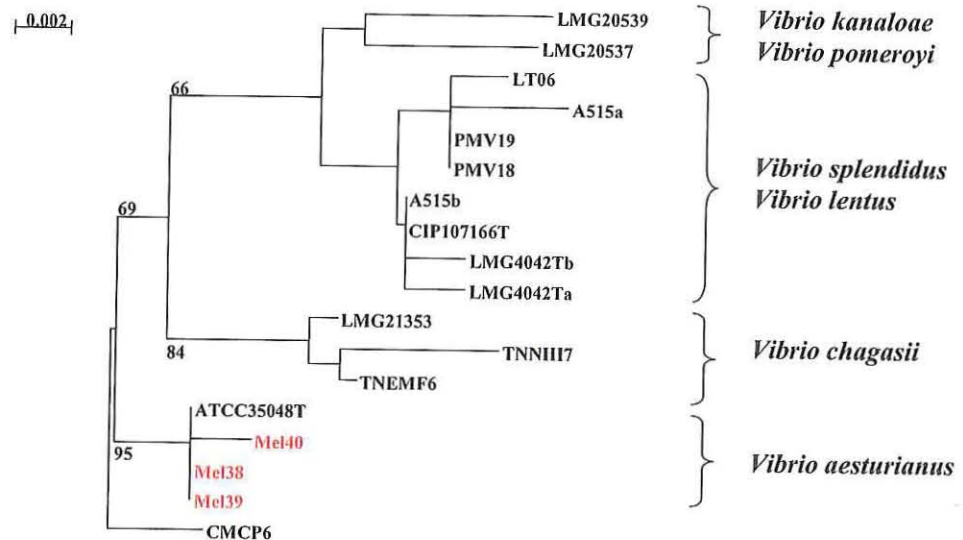
L'IP est un agent intercalant qui s'insère entre les deux brins de la double hélice d'ADN et qui ne peut pénétrer que si la membrane est détériorée, révélant ainsi l'état de mortalité des cellules

2.5.2.3 Etude de la phagocytose

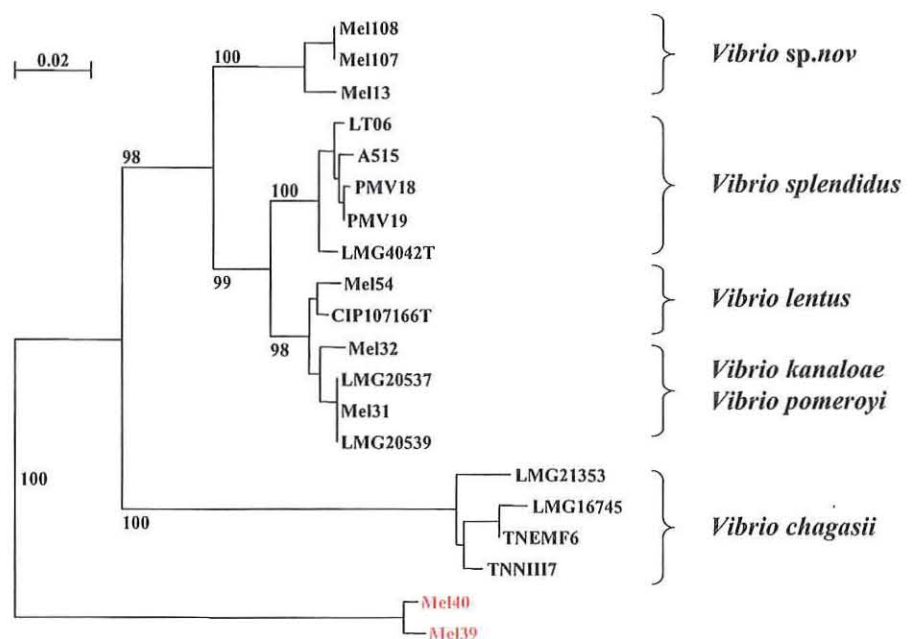
Les billes qui sont utilisées mesure 1 μm de diamètre et sont associées à un fluorochrome émettant entre 505 et 515 nm dont la fluorescence est recueillie sur le canal FL1 par le filtre 500-550. On considère qu'un hémocyte a phagocyté lorsque l'on note une fluorescence trois fois supérieure à la fluorescence d'une bille seule, de plus cela doit s'accompagner d'une augmentation des paramètres de taille et complexité de la cellule.

La solution mère de billes à $2.7 \cdot 10^{10}$ billes/mL est vortexée et diluée au 1/10 dans de l'eau distillée. 10 μL de billes diluées et vortexées sont ajoutés à 200 μL d'hémolymphe. L'ensemble est incubé 1 h à l'obscurité et à température ambiante avant passage au cytomètre.

Phylogénie moléculaire basée sur les séquences 16S: méthode Kimura 2 parameters et Neighbour joining, 490 sites, 500 bootstrap. Outgroup: *V. vulnificus*



Phylogénie moléculaire basée sur les séquences *gyrB*: méthode Kimura 2 parameters et Neighbour joining, 571 sites, 500 bootstrap.



3 Résultats

3.1 Identification

Ne sachant pas à quelles espèces appartiennent les bactéries du groupe J une identification sur des critères biochimiques et moléculaires a été réalisée.

3.1.1 Caractérisation moléculaire

3.1.1.1 Gène codant pour l'ARN 16S

Le séquençage partiel du gène codant pour la petite sous unité et l'étude phylogénique suggère que les souches Mel 38, Mel 39 et Mel 40 appartiennent à l'espèce *Vibrio aesturianus*. On remarque que les deux clones de la souche A515 ne se retrouvent pas dans les même clusters et que les bootstrap sont faibles.

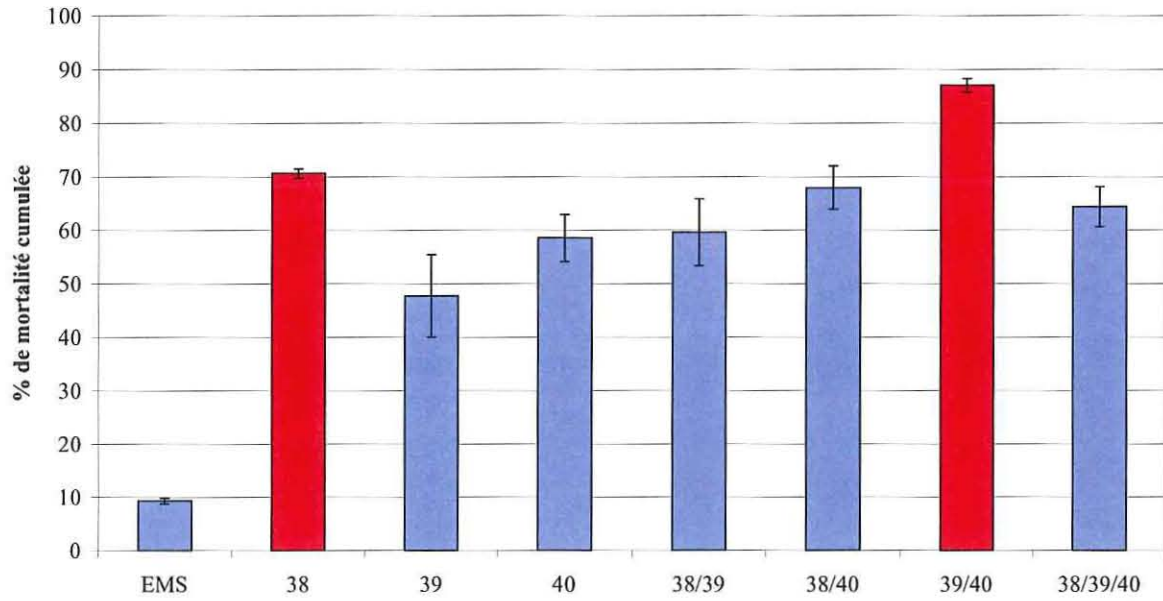
3.1.1.2 Gène GyrB

Le séquençage partiel du gène GyrB et l'alignement des séquences avec les séquences de référence des souches types nous permet de montrer que les bactéries Mel 39 et Mel 40 appartiennent à la même espèce qui est outgroup (annexe 1). La souche Mel 38, qui, en 16S, appartient à l'espèce *Vibrio aesturianus* n'a pu être séquencée pour le gène codant pour la gyrase.

3.2 Etude de la virulence des souches et développement de nouvelles approches.

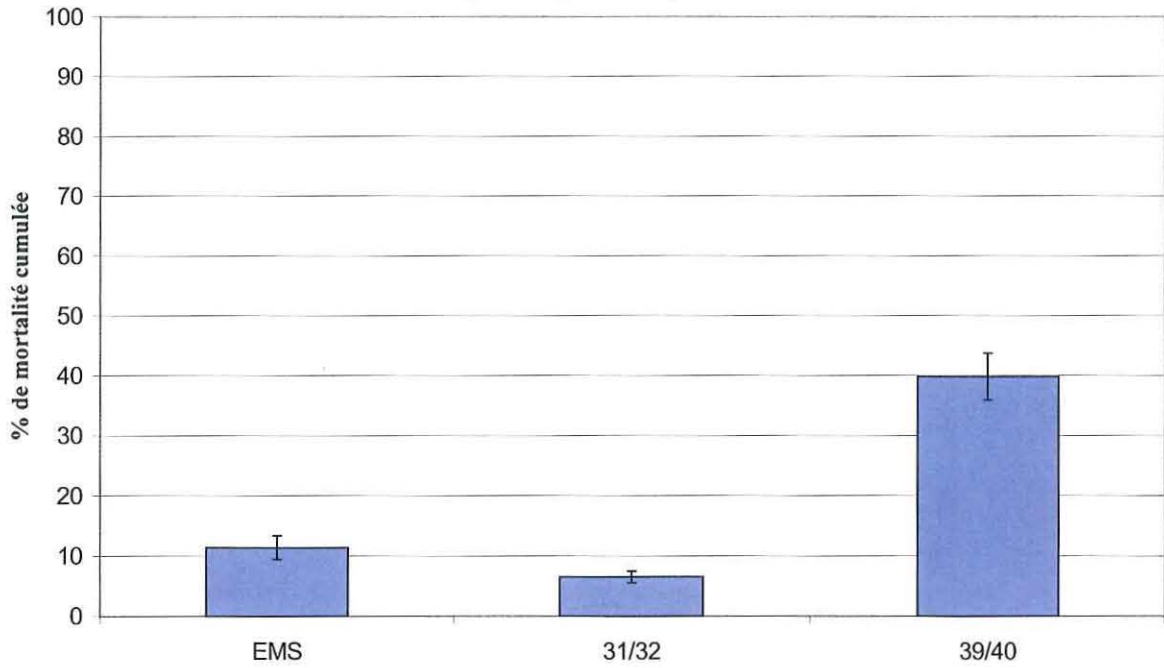
Pour étudier la virulence des différentes souches du groupe J, un découplage a été réalisé en injectant dans le muscle les souches individuellement, par deux ou par trois.

**% moyen de mortalité à J3
Injection musculaire**



Graphique 1

**% Mortalité moyenne à j3
Injections péricardiques**



Graphique 2

3.2.1 Etude de la virulence par découplage du groupe J.

Ce découplage (graphique 1) montre une forte virulence de la souche 38 seule (70 % de mortalité à j3) et une plus forte virulence des souches 39 et 40 lorsqu'elles sont injectées ensemble, 90 % à j3 pour l'association 39/40 et seulement 48 et 58 % respectivement pour 39 et 40 lorsqu'elles sont injectées seules et en quantité identique.

Les essais de reproduction de la pathogénèse par baignade ont pour le moment échoué avec les souches candidates (31/32). Cela peut être due au fait que les bactéries sont cultivées sur un milieu synthétique ou elles ne sont pas déterminées à être virulentes. D'autres techniques d'infections expérimentales ont été développées pour tenter d'élucider les voies naturelles de pénétration des bactéries dans l'huître.

3.2.2 Développement de nouvelles pathologies expérimentales

3.2.2.1 Muscle (couramment pratiqué)

L'injection de bactéries dans le muscle adducteur permet d'obtenir des résultats très rapidement, les résultats sont obtenus en trois jours. Cette injection permet de plus un meilleur contrôle des quantités de bactéries injectées. Les résultats montrent une bonne reproductibilité.

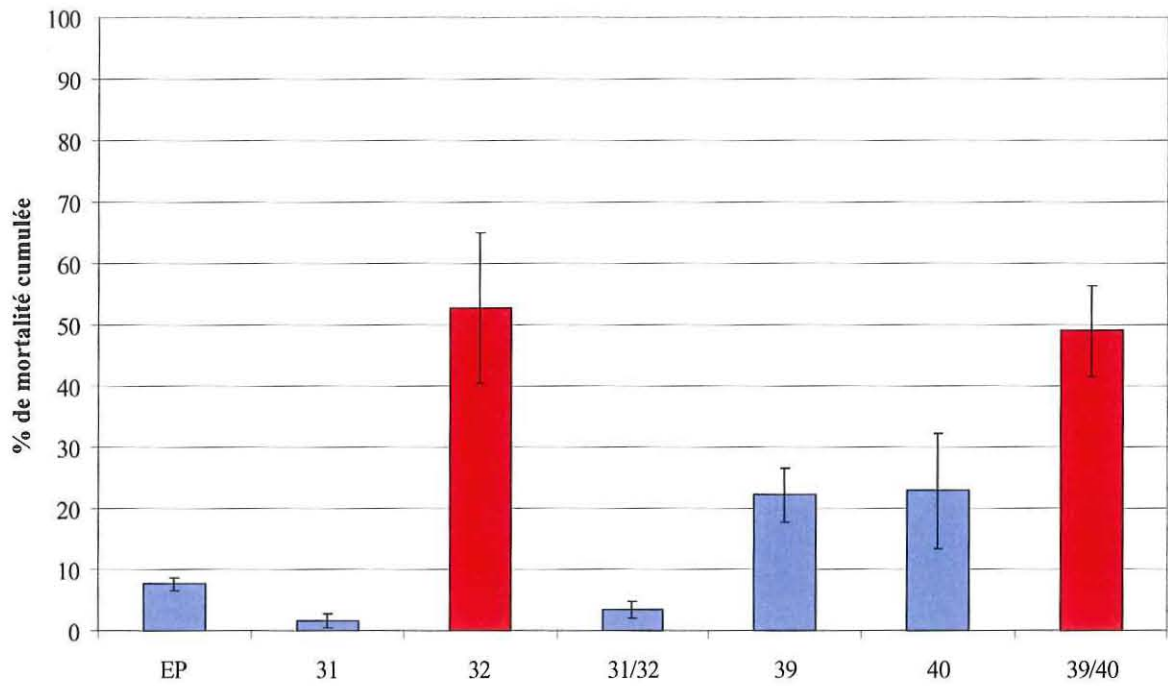
En contre partie cette injection ne reflète pas le mode de transmission possible dans le milieu naturel car cela shunt le franchissement des barrières naturelles de l'huître.

3.2.2.2 Cœur

L'injection dans le cœur fait apparaître un taux de mortalité de 40% à J3 pour l'association 39/40 alors que les témoins sont à 10 % (Graphique 2).

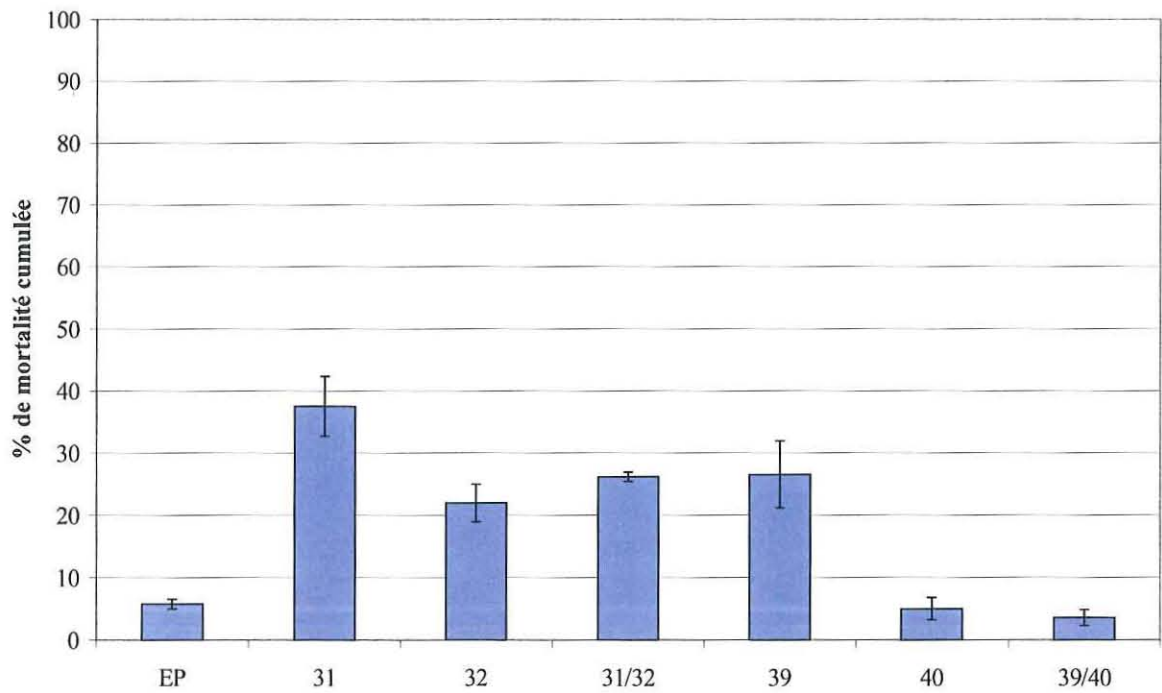
De même cette injection ne peut absolument pas refléter le mode de transmission naturel des bactéries.

**% moyen de mortalité à J5
Greffe de billes**



Graphique 3

**% moyen de mortalité à J5
Injection d'ECP**



Graphique 4

3.2.2.3 Billes

Des pathologies expérimentales ont été mises au point grâce à l'incorporation dans la cavité palléale de l'huître de bille servant initialement à la congélation des souches bactériennes.

La fixation des bactéries sur ces billes n'étant pas calibrée, il convenait de quantifier le nombre de bactéries présentes à la surface. Les résultats montrent qu'environ 10^6 bactéries se fixent sur les billes.

Cette technique, n'entraînant pas de lésions du muscle par piqûre, reflète plus un mode de transmission naturel.

Les résultats (Graphique 3) montrent une très bonne reproductibilité de la pathogénicité du groupe 39/40 avec environ 50 % de mortalité en 5 jours pour la coculture 39/40 et seulement environ 22 % de mortalité pour les souches 39 et 40 lorsqu'elles sont injectées seules.

Par contre, cette technique n'entraîne pas de mortalités pour le groupe 31/32 et la cinétique d'apparition des résultats est beaucoup plus longue que dans le cas de l'injection dans le muscle. Le modèle d'injection reste une bonne alternative dans le cas des bactéries Mel 39 et Mel 40 pour l'étude de la pathologie associée.

3.3 Etude des possibles facteurs de virulence

3.3.1 Essai d'injection d'ECP (graphique 4)

Les produits extracellulaires bactériens ont été injectés pour étudier leur possible toxicité sur l'huître. Les taux de mortalités à 5 jours sont de 25 % pour 39, 5 % pour 40 et 39/40 et 6 % pour le témoin négatif (injection d'eau peptonée).

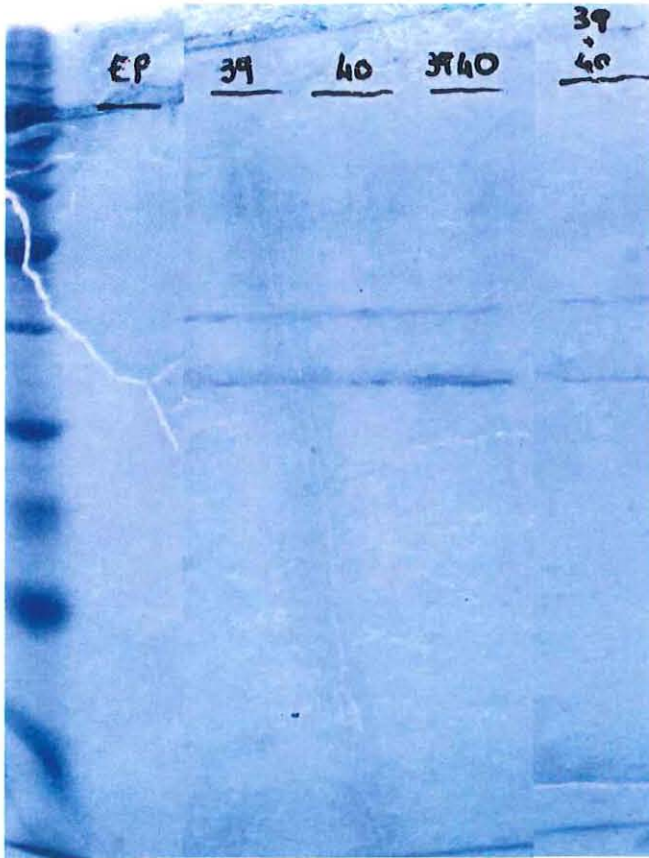


Photo gel 1

Gel de protéines totales issues d'ECP

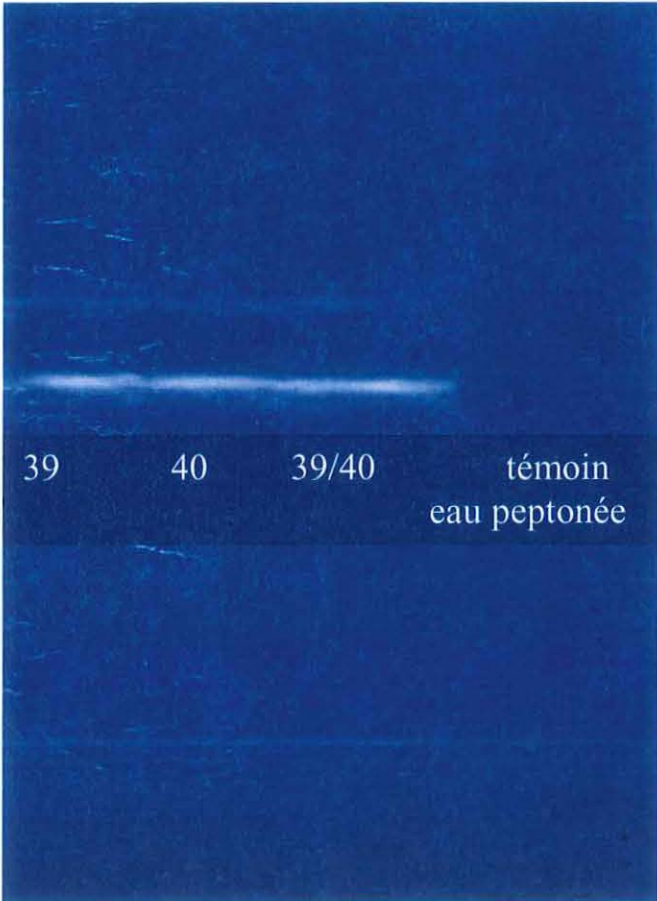


Photo gel 2

Gel de zymographie issue d'ECP.

3.3.2 Etude des protéines totales issues d'ECP

L'étude des protéines totales issues de produits extracellulaire fait apparaître deux bandes chez 39, 40 et chez l'association de 39 et 40. La bande la plus intense correspond à une protéine d'environ 53 kDa et la bande la plus faible à une protéine d'environ 60 KDa. Outre une intensité plus forte des bandes de l'association 39/40 on ne retrouve aucune différence dans l'expression des protéines totales que cela soit chez 39, 40 ou la coculture 39/40 (Photo gel 1).

3.3.3 Zymogramme sur protéines issues d'ECP

Deux bandes sont aussi retrouvées sur le zymogramme traduisant ainsi la présence de protéases. Ces deux bandes sont retrouvées dans les trois cas 39, 40 et la coculture 39/40 (Photo gel 2).

3.4 Etudes des lésions induites par les bactéries

Par la suite nous avons étudié les altérations tissulaires et cellulaires dues aux bactéries 39 et 40.

3.4.1 Etude de la pathologie

3.4.1.1 Description générale des lésions

Le muscle lorsqu'il est atteint ne l'est pas en totalité, seul un ensemble de fibres est lésé. Les fibres lésées ne sont plus jointives mais disjointes (photo 3), de plus elles apparaissent, la plupart du temps, en dégénérescence (photo 2). La glande digestive dispose généralement d'un épithélium pluristratifié (photo 8). Lors d'atteinte de cette glande, l'épithélium ne présente plus qu'une seule assise de cellules (photo 9). Le tissu conjonctif n'est pas lésé en lui-même mais est victime d'infiltrations de cellules circulantes. Cela se traduit par une très forte

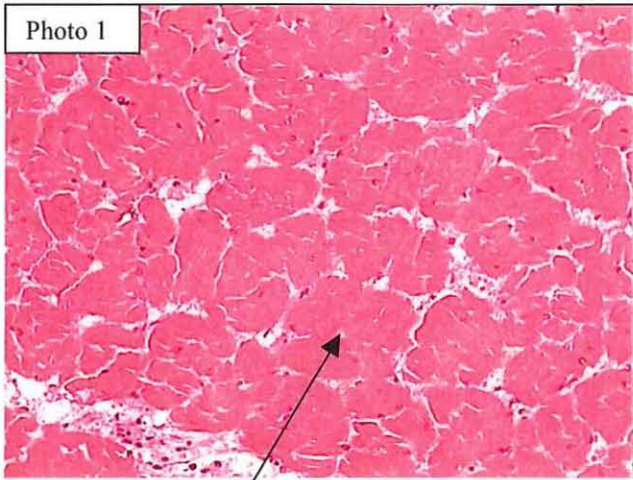


Photo 1
Muscle sain X20

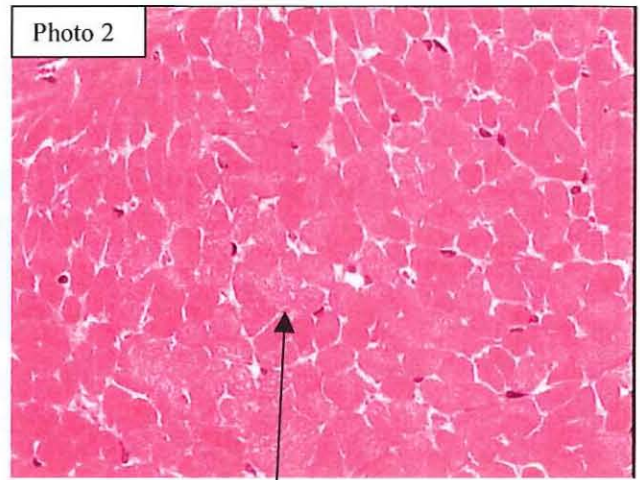


Photo 2
Fibres musculaires en cours
de dégénérescence X20

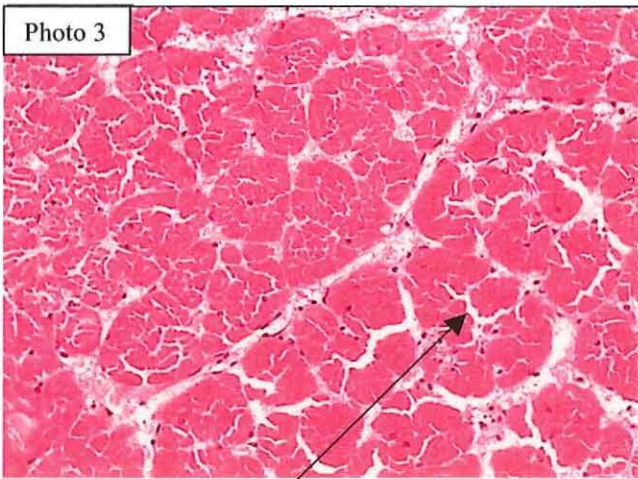


Photo 3
Fibres musculaires en cours
de dissociation X20

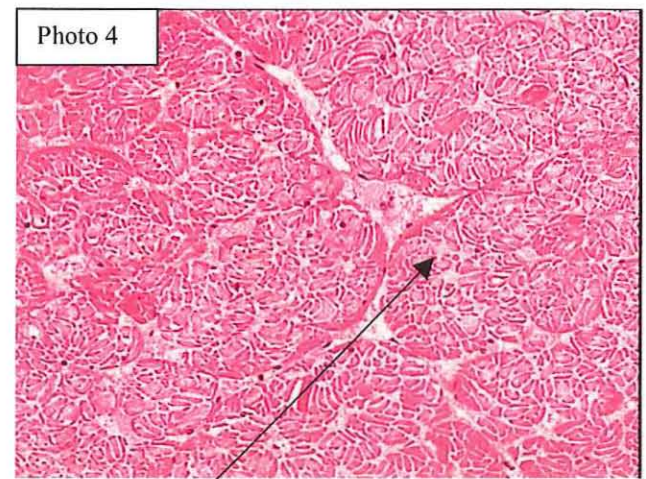


Photo 4
fibres musculaire dissociées
et dégénérantes X 20

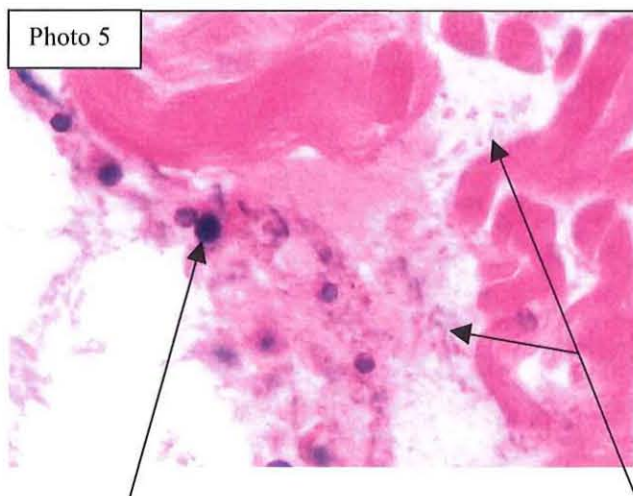


Photo 5
Hémocytes à noyaux condensés et bactéries X100

concentration en hémocytes et donc un aspect plus dense (photo 6 et 7). On retrouve le même phénomène pour les branchies.

3.4.1.2 Description des lésions provoquées par les témoins sur des huîtres moribondes

3.4.1.2.1 Injection musculaire

L'injection musculaire d'eau de mer stérile provoque une altération du muscle et de très légères lésions au niveau de la glande digestive mais aucune infiltration de cellules circulantes.

3.4.1.2.2 Implant de billes

L'implant de billes provoque des altérations plus ou moins forte du muscle et de la glande digestive. Le tissu conjonctif peut être aussi légèrement infiltré.

3.4.1.3 Description des lésions provoquées par Mel 39 seule sur des huîtres moribondes (annexe 1)

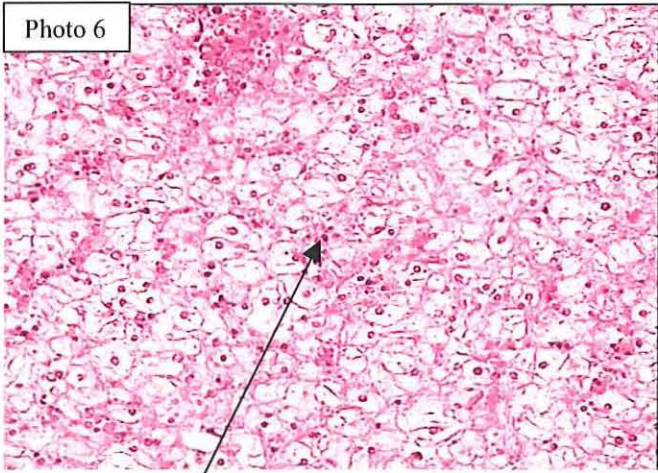
3.4.1.3.1 Injection musculaire

L' injection intramusculaire de 39 seule ne provoque pas de lésions visibles que cela soit au niveau du tissu conjonctif, de la glande digestive, des branchies ou du muscle.

3.4.1.3.2 Implant de billes

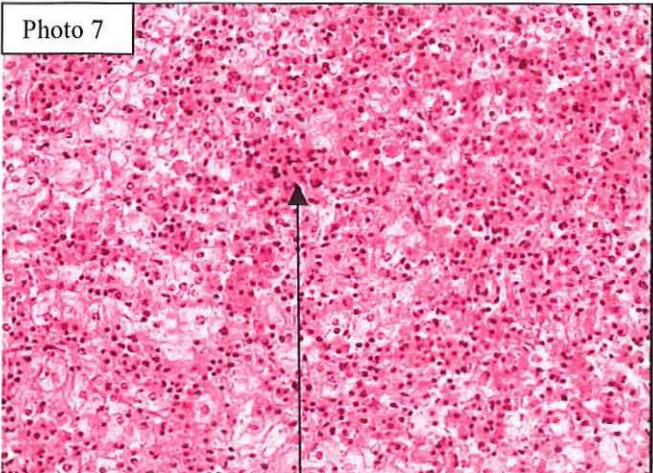
Le muscle ne présente pas de lésion particulière. Par contre on remarque une légère infiltration du tissu conjonctif. La glande digestive semble altérée. On observe quelques hémocytes à noyaux condensés.

Photo 6



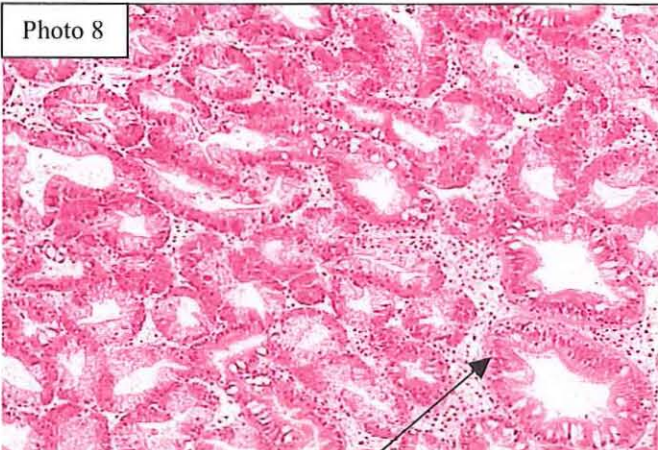
Tissus conjonctif non infiltré X10

Photo 7



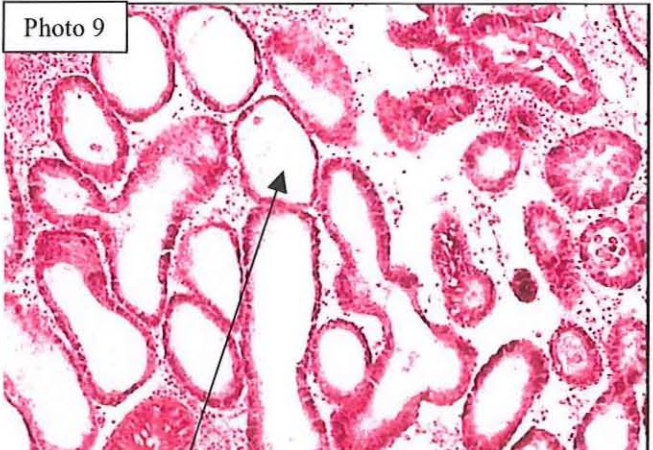
Tissus conjonctif infiltré X10

Photo 8



Diverticules digestifs sains X10
Avec épithélium pluristratifié

Photo 9



Diverticules digestifs altérés
au niveau de l'épithélium X10

3.4.1.4 Description des lésions provoquées par Mel 40 seule sur des huîtres moribondes (annexe 1)

3.4.1.4.1 Injection musculaire

Le muscle ne semble pas être altéré, on remarque cependant une infiltration du tissu conjonctif et des branchies mais pas du muscle. La glande digestive semble lésée. Les hémocytes présentent de rares noyaux condensés et de très rares noyaux anormaux.

3.4.1.4.2 Implant de billes

On retrouve ici une importante infiltration du tissu conjonctif, et des branchies qui présentent un aspect très dense en hémocytes traduisant une réelle inflammation. La glande digestive semble plus ou moins altérée selon les individus. Les hémocytes présentent quelques noyaux condensés. Le muscle ne présente pas de lésion significative.

3.4.1.5 Description des lésions provoquées par la coculture 39/40 sur des huîtres moribondes (annexe 1)

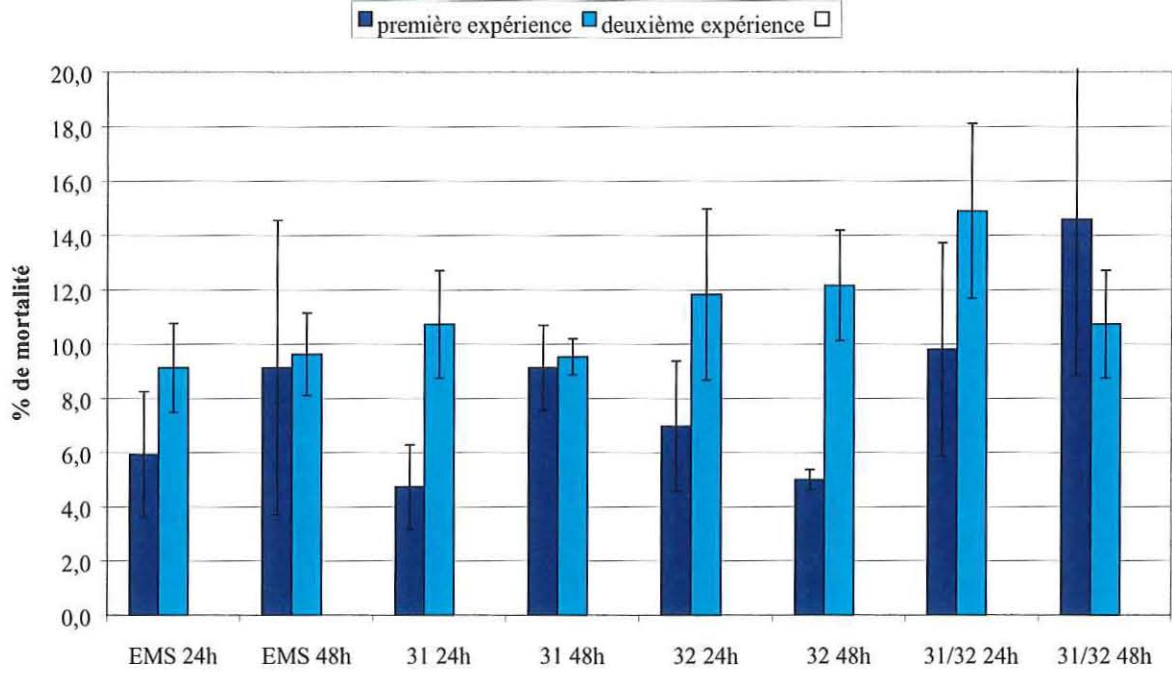
3.4.1.5.1 Injection musculaire

Le muscle et la glande digestive semblent lésés. Le tissu conjonctif et les branchies présentent une infiltration de cellules circulantes. On note la présence de quelques hémocytes à noyaux condensés.

3.4.1.5.2 Implant de billes

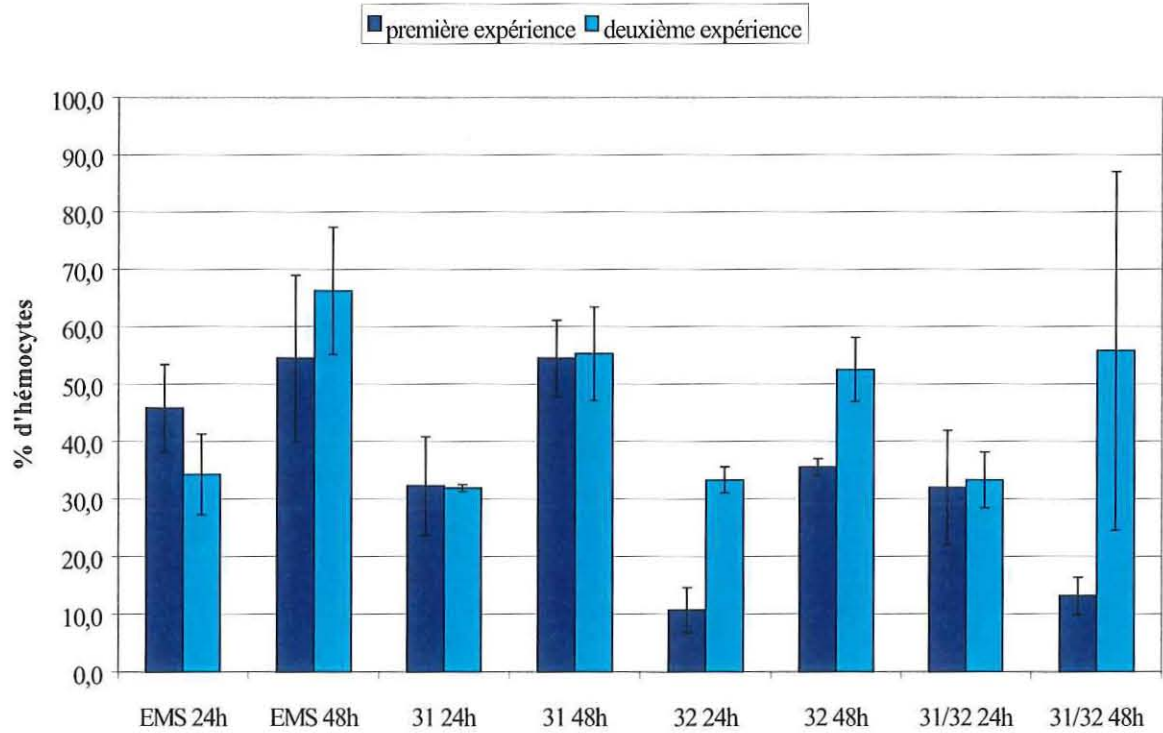
Le muscle et la glande digestive semblent altérés, avec des lésions plus ou moins fortes selon les individus. Le tissu conjonctif est infiltré par des cellules circulantes. Les branchies sont aussi légèrement infiltrées selon les individus. Les hémocytes présentent quelques noyaux condensés.

% de mortalité hémocytaire



Graphique 5

% d'hémocytes capable de phagocytose



Graphique 6

L'histopathologie est une approche globale, visuelle et se place au niveau de l'individu pour une étude des relations entre l'hôte et le pathogène, ici les bactéries et l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

3.4.2 Etude des hémocytes

Pour approfondir les connaissances sur ces interactions on a étudié les cellules responsables de l'immunité chez l'huître creuse, les hémocytes.

L'étude des altérations hémocytaires n'ayant jamais fait l'objet d'étude préalable, elle a été réalisée ici sur le modèle bactérien (souches Mel 31 et Mel 32) étudié au LGP.

3.4.2.1 Cytométrie en flux

Par différents marquages la cytométrie en flux permet une étude des altérations hémocytaires causées par les bactéries.

3.4.2.1.1 Etude de la mortalité hémocytaire

Deux expériences ont été réalisées, dans la première on note, à 24h, comme à 48h une augmentation entre 3 % et 4 % de la mortalité des hémocytes induite par la coculture de 31/32. Pour la seconde expérience ce résultat n'est retrouvé qu'à 24h et pas à 48h après l'injection (Graphique 5).

3.4.2.1.2 Etude de la phagocytose

Lors de la première expérience, 24h après l'injection on note une baisse des capacités phagocytaires des hémocytes ayant été en contact avec la souche 31, avec 32 % d'hémocytes ayant phagocytés au moins trois billes. On note aussi une baisse pour la souche 32 et pour l'association 31/32 avec respectivement des pourcentage de 11 % et 32 % alors que le témoins est à 45 %. 48h après l'injection les hémocytes en contact avec la souche 32 voient leur capacité phagocytaire diminuée puisque le pourcentage baisse à 35 %. On retrouve le

même phénomène pour l'association 31/32 puisque le pourcentage baisse à 13 %. Le témoin à 48h ayant un pourcentage d'hémocytes ayant phagocytés de 54 % (Graphique 6).

Lors de la seconde expérience, 24h après l'injection, on ne retrouve aucune différence entre les capacités de phagocytose des différents essais et témoins. Quarante huit heures après l'injection on note un baisse de la capacité à phagocyter des hémocytes en contact avec la souche 31, 55 % d'hémocytes ayant pahagocytés, de ceux en contact avec 32, 52 % et de ceux en contact avec l'association 31/32, 55 %, alors que le témoins présentent un pourcentage d'hémocytes ayant phagocytés de 67 %.

On remarque aussi que les valeurs de phagocytose augmentent toujours à 48h par rapport à celle de 24h.

4 Discussion

Le phénomène des mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas* reste très complexe et les agents pathogènes, notamment les *Vibrios* marins, semblent y jouer un rôle important.

La caractérisation de souches bactériennes pathogènes repose sur leur identification taxonomique, sur l'étude de leur virulence et sur l'étude de la pathologie associée.

Les résultats précédemment obtenus en biochimie ne permettent pas d'identifier clairement l'espèce à laquelle appartiennent les bactéries du groupe J.

La caractérisation taxonomique reste très importante d'un point de vue épidémiologique puisqu'elle permet de diagnostiquer certaines bactéries comme appartenant à des groupes d'espèces potentiellement à risque.

L'identification taxonomique de souches bactériennes repose sur des techniques d'hybridation ADN/ADN. Pour éviter ces techniques lourdes et fastidieuses on utilise le séquençage de gène et l'analyse phylogénétique.

Ainsi le séquençage du gène codant pour la sous unité ribosomique 16S est très répandu. Or cette phylogénie ne permet pas de discriminer convenablement les espèces du groupe polyphylétique des *Vibrio splendidus*. De plus, la présence des deux clones de la souche A515 dans deux clusters différents illustre bien le problème posé par le polymorphisme intercopies. Les souches Mel 38, Mel 39 et Mel 40 semblent appartenir à l'espèce *Vibrio aesturianus*. Ce résultat doit être confirmé par une technique d'hybridation ADN/ADN qui est la technique de référence pour l'identification bactérienne.

Le gène codant pour la sous unité B de la gyrase a été séquencé pour permettre la discrimination d'espèces proches.

La souche Mel 38 est très difficile à séquencer, peut être à cause du manque de spécificité des amorces dégénérées utilisées. Au sein du groupe polyphylétique des *Vibrio splendidus* la phylogénie basée sur le séquençage du gène GyrB permet de discriminer plus aisément les espèces.

La séquence du gène codant pour la gyrase de *Vibrio aesturianus* n'est pas encore connue et l'on ne peut donc pas certifier que les bactéries 39 et 40 sont des *Vibrio aesturianus*, bien que ces souches soit regroupées et séparées des autres clusters par un bootstrap fort. Pour confirmer leur appartenance à l'espèce *Vibrio aesturianus*, il faudrait connaître la séquence de la souche de référence et réaliser en plus les hybridations ADN/ADN.

L'étude de la virulence se fait par injection de culture bactérienne dans le muscle adducteur de l'huître. Cette technique est, par comparaison aux autres, efficace, reproductible et sa cinétique est rapide puisque les résultats sont obtenus après trois jours.

La souche 38 présente une virulence forte lorsqu'elle est injectée seule et ne semble pas coopérer avec d'autres souches. Les souches 39 et 40, lorsqu'elles sont injectées seules présentent une virulence plus faible que 38. Mais lorsqu'elles sont injectées ensemble leur virulence est augmentée. Ce résultat montre que la collaboration 31/32 n'est pas un épiphénomène et peut être retrouvée chez d'autres espèces de *Vibrio*.

L'infection expérimentale réalisée avec les billes permet également d'induire des mortalités avec les souches 39 et 40 avec les mêmes phénomènes que lors d'une injection intramusculaire. Ce mode d'infection se rapproche plus du mode d'infection par baignade qui tente de reproduire le plus fidèlement le mode de transmission naturel. Or cette infection ne permet pas de reproduire les

mortalités observées pour les souches Mel 31/Mel 32. Il y a peut être un problème de fixation d'une des souches sur les billes. L'approximation de la quantité de bactéries sur les billes nous donne 10^6 bactéries sur une bille, mais elle ne nous donne pas quelle bactérie se fixe sur les billes à savoir les deux ou une majorité de l'une.

L'infection expérimentale réalisée par injection intracardiaque montre une reproductibilité de la mortalité due au groupe 39/40 mais cette technique reste trop directe et trop éloignée de la transmission dans le milieu naturel.

L'étude des protéines révèle la présence de protéases produites et excrétées par les bactéries. De nombreuses études ont déjà révélées la production par les bactéries de nombreuse exotoxines et notamment la production de métalloprotéases. [3,4,8]

On observe une légère action des ECP sur les huîtres puisqu'ils entraînent pour l'injection de 31, 32, l'association 31/32 et 39 plus de 20 % de mortalité alors que les témoins restent à 5 % de mortalité. La quantité d'ECP (5 μ g) injectée n'est peut être pas assez suffisante pour révéler leur réelle action il faudrait donc trouver la dose létale entraînant 50 % de mortalité.

La description des lésions dues à l'injection des bactéries ou à l'implant de billes montre que l'association des deux bactéries 39 et 40 altère le muscle de façon significative par rapport aux souches lorsqu'elles sont utilisées seules. On ne retrouve pas de différence aussi significative chez les autres organes entre les altérations causées par les souches seules et les altérations causées par l'association 39/40. Les témoins, que cela soit pour l'injection ou pour l'implant de billes, présentent aussi des altérations de la glande digestive et du muscle.

Ceci peut s'expliquer par le fait que les huîtres des lots témoins ont été prélevées moribondes. Pour avoir un témoin fiable il aurait fallu prélever pour chaque condition des huîtres vivantes.

Même si les résultats ne sont donc pas interprétable en l'absence de témoins adaptés on peut quand même soupçonner une attaque du muscle par l'association des souches Mel 39/Mel 40 puisque les lésions observées pour le muscle sont identiques pour l'implant de bille et pour l'injection intramusculaire.

Les résultats observés en cytométrie en flux montrent une probable action de l'injection de la coculture 31/32 que cela soit au niveau de la mortalité hémocytaire ou de la capacité des hémocytes à phagocyter. Or ces résultats n'ont pu être reproduits lors de la seconde expérience. La méthode de ponction de l'hémolymphe peut jouer un rôle dans la qualité des résultats puisque de récents essais par d'autres laboratoires ont montré qu'une ponction dans le muscle adducteur permettrait de récolter plus d'hémolymphe, certes plus diluée, mais surtout beaucoup moins contaminée par des gamètes ou par des débris. En ces périodes estivales, l'huître creuse devient mature et les gonades prennent une place très importante ce qui rend très difficile la ponction cardiaque et donne une hémolymphe souvent chargée en gamètes ce qui peut fausser les résultats. [11] Ainsi une ponction intramusculaire pour récolter de l'hémolymphe pourrait permettre une étude des hémocytes non circulants et plus proche des lésions induite par l'association 31/32.

5 Conclusion et perspectives

Au vue des résultats obtenus on peut aujourd'hui dire que le phénomène des mortalités estivales n'est pas dû à une souche unique et donc que ce n'est pas une épizootie.

Les 3 bactéries du groupe J, Mel 38, Mel 39 et Mel 40 présentent une certaine virulence. Deux souches, Mel 39 et Mel 40 coopèrent pour tuer l'hôte. Ce phénomène de coopération n'est pas unique et se retrouve pour d'autres espèces de *Vibrio*, comme *Vibrio lentus* (Mel 31/Mel 32) ou *Vibrio morestus* (Mel 7/Mel 8). Ce n'est donc pas un épiphénomène et l'on pourrait même supposer que c'est un phénomène répandu dans le cas des mortalités estivales.

La caractérisation taxonomique n'est pas aisée dans le cas des *Vibrio* marin mais il semblerait que les bactéries du groupe J appartiennent à l'espèce *Vibrio aesturianus*. Chez cette espèce de bactéries peu de souches virulentes ont été identifiées.

La description des lésions induites sur l'huître est très importante et permet d'aborder la pathogenèse, le mode d'action des bactéries et les phénomènes de coopération entre souches. Dans le cas du groupe J cette étude histopathologique doit être poursuivie pour confirmer les lésions spécifiques induites par l'association des deux souches Mel 39/Mel 40. De plus les outils de biologie moléculaire comme la génomique soustractive permettront de développer des sondes spécifiques pour réaliser de l'hybridation *in situ*.

Les études de cytométrie n'ont pas révélées d'altération spécifique des cellules circulantes. Or les hémocytes étant les cellules de l'immunité elles devraient

logiquement, au vue des altérations observées au microscope, présenter des altérations ou des variations d'activité plus évidentes. Ainsi d'autres études (*in vivo* et *in vitro*) sont nécessaires pour clarifier ces altérations.

Les *Vibrio* marins présentent de nombreux mécanismes de virulence. Dans le cas des bactéries du groupe J, la production de protéases reste un mécanisme possible qu'il conviendrait d'étudier plus en détail par d'autres essais d'infection expérimentale et par une caractérisation plus précise des protéases produites.

La flore bactérienne commensale est très diversifiée (*Vibrio splendidus*, *Vibrio aestuarianus*) ce qui complique la détection des bactéries pathogènes. Afin de développer des outils moléculaires de détection des souches de *V.aestuarianus* virulente une approche de génomique soustractive sera initiée.

En parallèle, une production de mutants bactériens résistants à certain antibiotiques permettrait de quantifier les bactéries présentes dans l'hémolymphe. De plus la pression de sélection de l'antibiotique peut induire l'apparition de mutation qui peuvent être utilisées pour étudier certain gènes de virulence.

6 Bibliographie

[1] Gouilletquer P., Soletchnik P., Le Moine O., Razet D., Gearon P., Faury N., Taillade S., (1998) **Summer mortality of the pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the bay of Marennes Oléron.** ICES Mariculture committee CM 1998/CC.pp14-21

[2] Le Roux F., Gay M., Lambert C., Waechter M., Poubalanne S., Chollet B., Nicolas J.L., Berthe F., (2001) **Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolates during *Crassostrea gigas* mortality events.** Aquatic living resources 15 (2002) 251-258

[3] Jeanette W.P.Teo., Lian-hui Zhang, Chit Laa Poh (2002) **Cloning and characterization of a metalloprotease from *Vibrio harveyi* strain AP6.** Gene (2002) 1-10

[4] Farto R., Pérez M.J., Frenandez-Biera A., Nieto T.P.(2002) **Purification and partial characterization of a fish lethal extracellular protease from *Vibrio pelagius*.** Veterinary Microbiology 89 (2002) 181-194

[5] Lambert C., Nicolas J.L., Bultel V.(2001) **Toxicity to Bivalve Hemocytes of Pathogenic *Vibrio* Cytoplasmic Extract.** Journal of Invertebrate Pathology 77 (2001) 165-172

[6] Waechter M., Le Roux F., Nicolas J.L., Marissal E., Berthe F.(2002) **Caratérisation de bactéries pathogènes de naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas*.** C.R. Boilogies 325 (2002) 231-238

[7] Lacoste A., Jalabert F., Malham S., Cueff A., Gélébart F., Cordevant C., Lange M., Poulet S.A. (2001) **A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix.** Diseases of aquatic organisms (2001) Vol. 46: 139-145

[8] Borrego J.J., Luque A., Castro D., Santamaria J.A., Martinez-Manzanares E. (1996) **Virulence factors of *Vibrio* P1, the causative agent of brown ring disease in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*.** Aquatic living resources (1996), 9, 125-136

[9] Alsina M., Blanch A.R. (1994) **A set for biochemical identification environmental *Vibrio* species.** Journal of applied bacteriology 76, (1994) 79-85

Annexes

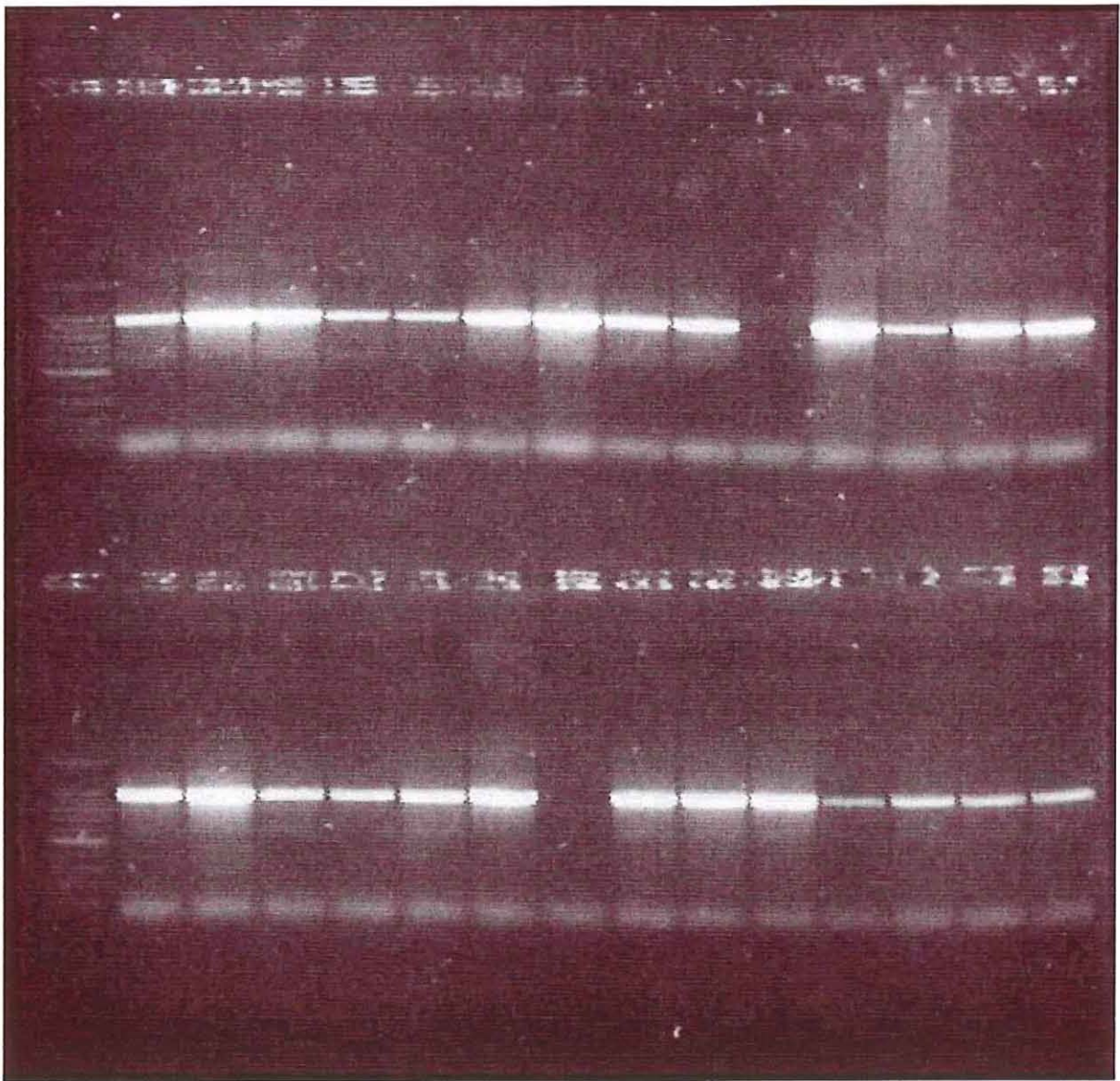
bactéries	Lésions du muscle	Lésions du tissu conjonctif	Hémocytes	Lésions des branchies	Lésions de la glande digestive
39 seule	Aucunes	Aucunes		Aucunes	Aucunes
40 seule	Aucunes	Infiltration et aspect condensé	Rare hémocytes à noyaux condensé	Infiltrées sur toute la surface	Altérée
39/40	Plus ou moins lésé avec des lésions centrées dans le muscle	Infiltré et aspect condensé	Rare hémocytes à noyaux condensé	Infiltrées sur toute la surface	Légèrement Altérée

Tableau récapitulatif des lésions histologiques dues à l'injection intramusculaire

Annexe 1

Bactéries	Lésions du muscle	Lésions du tissu conjonctif	Hémocytes	Lésions des branchies	Lésions de la glande digestive
39 seule	Aucunes	Infiltré avec un aspect condensé	Très rare hémocytes à noyaux condensé	Infiltrées sur toute la surface	altérée
40 seule	Aucunes	Grosse infiltration et aspect condensé	Rare hémocytes à noyaux condensé	Plus forte infiltration sur toute la surface	Légèrement altérée
39/40	Plus ou moins lésé avec des lésions centrées dans le muscle	Légère infiltration	Très rare hémocytes à noyaux condensé	Légère infiltration	altérée

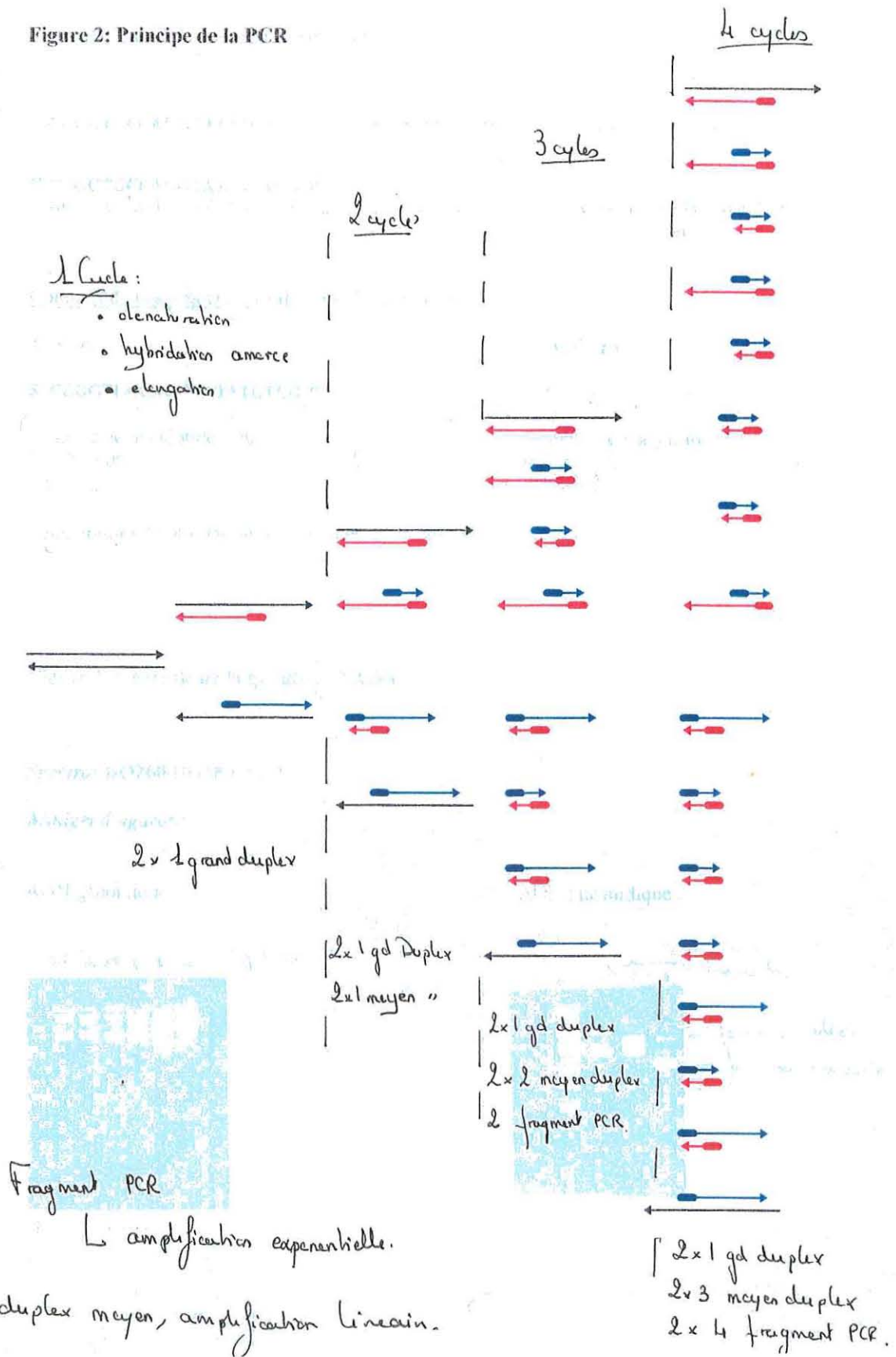
Tableau récapitulatif des lésions histologiques dues à la greffe de billes



Exemple de gel d'agarose à 1 %

Annexe 2

Figure 2: Principe de la PCR



Annexe 3

Exemple d'injection intramusculaire



Exemple d'implant de bille



Bille derrière le muscle



Dispositif expérimental

Annexe 4