

Université Fédérale de Santa Catarina au Brésil

Centre des Sciences Agraires

Département d'Aquaculture



**Étude de la phagocytose des hémocytes d'huître creuse
Crassostrea gigas en présence de bactéries apparentées à *Vibrio
splendidus***

Maria Clara Gonçalves

Stage du 15 Mai 2006 au 7 Juillet 2006

Florianópolis / SC - Brésil

2006

Université Fédéral de Santa Catarina

Centre de Sciences Agraires

Département d'Aquaculture

Étude de la phagocytose des hémocytes d'huître creuse *Crassostrea gigas* en présence de bactéries apparentées à *Vibrio splendidus*

Rapport de Stage Supervisé II (AQI5240) du Cours de Génie d'Aquaculture

Maria Clara Gonçalves

Maître: Prof. Dr. Aimê Rachel de Queiroz

Superviseur: Denis Saulnier

Entreprise: Institut Français de Recherche pour L'Exploitation de la Mer – Ifremer,
Laboratoire Génétique et Pathologie, La Tremblade – France

Florianópolis / SC – Brésil

2006.1

REMERCIEMENTS

Je remercie toute ma famille et mon petit ami, personnes que toujours me stimulent et m'aident quand j'ai plus besoin. Je remercie les employés du Parc de la Francophonie du Brésil qui a viabilisé l'événement de ce stage. Je remercie au Lycée de la Mer et du Littoral (Bourcefranc le Chapus) qui m'a accueilli avec respect et dévouement pendant tout le stage. Je remercie l'équipe d'Ifremer – Station La Tremblade que m'a fait aimer plus la science e m'ai donnée l'honneur de travailler dans un laboratoire très reconnu et de grande technologie. Je remercie le Cours de Génie d'Aquaculture de l'Université Fédéral de Santa Catarina qui m'a préparé pour affronter le champ de travail.

SOMMAIRE

1. Introduction.....	6
2. Description d' Entreprise.....	12
3. Matériels et Méthodes.....	15
3.1) <i>Infection expérimentale d'huîtres Crassostrea gigas avec Vibrio splendidus</i>	
3.2) Evaluation de la sensibilité du test de quantification colorimétrique des bactéries <i>V. splendidus</i> cultivées <i>in vitro</i>	
3.3) Testage des concentrations optimales d'utilisation du cloramphenicol en microplaques.....	18
3.4) Test d'interaction hémocytes – vibrions.....	19
4. Resultats.....	21
4.1) Mortalités de <i>Crassostrea gigas</i> infectées expérimentalement avec <i>V. splendidus</i>	21
4.2) Sensibilité du test de quantification colorimétrique de <i>V. splendidus</i>	
4.2.1) Cas de la souche LGP 32	
4.2.2) Cas de la souche LMG 20012T.....	22
4.2.3) Cas de la souche TR 32	
4.3) Effet bactériostatique du cloramphenicol en microplaque	26
4.4) Quantification des bactéries viables intra et extra (plasma) hémocytaire en fonction du temps de contact entre les <i>Vibrio</i> (souche TR32) et l'hémolymphe.....	27
5. Discussion.....	31
6. Bibliographie.....	34
7. Annexes.....	37

ABSTRACT

It's known that the development the world-wide oyster production is propitious to increase the presence of pathogens, mainly if the activity is not monitorized. *Vibrio splendidus* related-species were associated with mortalities of mollusks, gorgonians and marine fishes. The present study evaluates the hemocytes capacity of phagocytosing different bacterial concentrations and quantifies the living bacteria after the phagocytosis in *Crassostrea gigas* oyster. For that, a colorimetric reagent MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium] and PMS (phenazine metasulphate) was used to identify significant bacterial concentrations in the hemocytes and plasma of *C. gigas* hemolymph. The utilization of strains virulent and non-virulent has permitted the comparison of virulence effects on the phagocytosis process. It was also tested the sensibility limit of strains concentrations related with the reagent MTS/PMS. Samples were put during all the assay in micro-plates because of the faster manipulation and better visualization and distribution of the results.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- EMA: eau de mer artificielle
- CFU ou UFC: unités de formations de colonies
- DO: densité optique

1. Introduction

L'élevage de bivalves représente une production mondiale de 9 millions tonnes/an. Un tiers de cette production est représenté par les huîtres (3 millions tonnes/an). Il y a 10 à 15 espèces des huîtres cultivées au monde. L'huître creuse *Crassostrea gigas* est l'espèce la plus produite en raison de son potentiel aquacole : grande robustesse, croissance rapide, grande capacité d'adaptation à des écosystèmes variés, zootechnie bien maîtrisée.

Au Brésil il y a un grand potentiel pour le secteur en raison de l'importance du littoral, long de 8400km, et de la température d'eau élevée qui favorise une croissance rapide des huîtres. L'élevage brésilien de mollusques bivalves est encore embryonnaire avec une production annuelle de 9000 tonnes/an qui représente actuellement 14% en valeur de la production aquacole nationale. L'état de Santa Catarina est le plus grand producteur brésilien d'huîtres creuses, avec 1600 tonnes produites en 2001. La région de Florianopolis, où les producteurs sont plus concentrés, dispose de nombreux estuaires, baies et anses qui protègent les structures d'élevage. Le secteur ostréicole est en plein essor. Cependant il est probable qu'avec l'intensification des méthodes d'élevage, des maladies infectieuses puissent émerger à l'avenir. Malgré un faible nombre de travaux sur les pathologies des mollusques élevés au Brésil, ces études ont montré la vulnérabilité des élevages brésiliens vis à vis des risques de survenue d'épizooties. Sur le littoral de Pernambuco (au nord-est du Brésil) des infections bactériennes ont été décrites chez les huîtres de mangrove *Crassostrea rhizophora* (Azerole et al., 2005). Silveira Jr. (1997) a étudié depuis 1987 le syndrome de mortalité en masse d'été (MME) affectant plusieurs mollusques bivalves tels *C. gigas* et *C. rhizophorae*. L'une des hypothèses avancée par ce dernier auteur est que l'élévation de la température de l'eau et/ou la période de ponte créent un stress chez les animaux qui deviennent alors plus sensibles à des agents infectieux tels que *Nocardia* sp., cet agent ayant été détecté au Brésil chez des animaux malades. En dehors des infections bactériennes de nombreux parasites ont été décrits au Brésil, avec une prévalence élevée. Il s'agit

des espèces *Polydora* sp., *Nematopsis* sp., *Trichodina* sp. et *Tylocephalum* sp. (Sabry & Magalhães, 2005).

En Europe, le principal producteur de *C. gigas* est la France avec une production annuelle de 130.000 tonnes répartie sur 2500 entreprises de production ou exploitation. La région la plus importante économiquement pour l'ostréiculture française est Marennes Oléron (fig. 1b), avec la commercialisation de 60.000 tonnes par an (45% de la production nationale). La disposition géographique des élevages présente une forte ressemblance avec la région de Florianopolis du fait de l'existence dans les deux cas de baies protégées propices à l'ostréiculture et d'estuaires. Comme sur le littoral brésilien, une des plus grande menace au développement durable des élevages des huîtres est la présence dans le milieu d'agents potentiellement pathogènes. Dans les années 1970, les élevages d'huître plate *Ostrea edulis*, qui constitue une espèce endémique du littoral français, ont été décimés (chute de 90% de la production) par deux epizooties, causées par les parasites *Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae* (Grizel et al., 1974 ; Pichot et al., 1980). Durant le même période, l'huître portugaise *Crassostrea angulata*, cultivée sur la façade atlantique française, a été totalement décimée, probablement par un agent viral, un iridovirus (Comps & Uthoit, 1975). C'est à la suite de la disparition de cette espèce que l'huître creuse *C. gigas* a été introduite en France. Après un développement exponentiel de la production pendant une vingtaine d'année, des mortalités estivales de naissains élevés en milieu naturel et en éclosérie ont été observées à partir de 1991, avec des mortalités pouvant atteindre dans certain cas 60 a 100%. L'étiologie de ce syndrome sévissant de façon saisonnière est plurifactoriel et est la résultante d'interactions complexes entre le statut physiologie et ou génétique des animaux, des facteurs environnementaux et la présence d'agents pathogènes (Gouletquer et al, 1998). A ce jour seuls l'hépesvirus OSHV1 (Oyster Herpesvirus 1) (Renault et al 1994) et plusieurs souches appartenant aux deux espèces *Vibrio splendidus* (Le Roux et al 2002) et *V. aestuarianus* (Labreuche et al 2005) ont été dans quelques cas associés à ces mortalités. Il semble que ces pathogènes agissent davantage comme des opportunistes que comme des agents pathogènes « vrais ».

Les vibrions forment l'un des groupes bactériens les plus abondants dans les écosystèmes aquatiques et l'espèce *V. splendidus* (fig.2a) est l'une des espèces dominantes (Thompson et al 2004). Il peut infecter plusieurs espèces de mollusques et du fait de son caractère ubiquitaire se retrouve également chez les coraux et plusieurs espèces de poissons. Une souche dénommée LGP32 a été particulièrement étudiée au LGP du fait de sa virulence démontrée par infection expérimentale d'huître saines (Gay et al, 2004 a). L'étude de la pathogenèse par l'histologie et la microscopie électronique révèlent que cette souche se localise préférentiellement au niveau du muscle adducteur et notamment à sa périphérie provoquant une dégénérescence de fibres musculaires (fig. 2c). L'unique symptôme trouvé chez huîtres est l'affaiblissement du muscle adducteur. Certaines souches apparentées à l'espèce *Vibrion splendidus* sont virulentes en infection expérimentale tandis que d'autres, très proches des souches virulentes d'un point de vue taxonomique, ne le sont pas (souches avirulentes) (Le Roux et al., 2004). Le déterminisme génétique de la virulence chez la souche LGP32 est en cours d'étude au laboratoire par des approches de biologie moléculaires : 1) séquençage complet du génome de cette souche (collaboration avec l'Institut Pasteur de Paris) et 2) construction de banques soustractives (SSH Suppressive subtraction Hybridization) à partir de LGP32 et d'une souche avirulente (LMG20012T) pour l'identification de gènes spécifiques de la virulence. Plusieurs gènes candidats à la virulence ont été identifiés tels ceux codant des protéases (metalloprotéase, hémolysosines, toxine RTX), des protéines impliquées dans le transport et la synthèse de sidérophores, où un ensemble de protéines potentiellement impliquées dans la synthèse d'une capsule polysaccharidique (CPS).

Selon Volety et al. (1999), une fois infectée, les huîtres activent des mécanismes de défense à médiation cellulaire et/ou humorale. Les hémocytes (fig. 3a, 3b) sont les seules cellules immunitaires connues à ce jour chez les mollusques et sont présentes dans le sang ou hémolymphe de l'animal. Ces cellules sont responsables de différents phénomènes: inflammation, cicatrisation, production d'ions super oxydes, phagocytose et/ou encapsulation.

L'étude présente vise à évaluer, *in vitro*, la capacité des hémocytes d'huître creuse *C. gigas* à phagocyter les bactéries apparentées à *V. splendidus* en recherchant les bactéries viables intra et extra (plasma) hémocytaire.

Cet objectif a nécessité la mise au point au préalable d'un test colorimétrique permettant de quantifier aisément les bactéries viables au cours de la phagocytose.

Ainsi, ont été testés colorimétriquement deux souches bactériennes *V. splendidus*, une virulente (LGP32) et une avirulente (LMG20012), différents temps de contact des hémocytes en présence de différentes concentrations de bactéries, pour l'analyse quantitative des bactéries viables intra et extra (plasma) hémocytaire. Le test colorimétrique est basé sur l'utilisation de deux substrats pour l'enzyme NADH₂ : MTS [3-(4,5-dymhetyltiazol-2-yl)-5-(3-carboximhetoxyphenyl)-2-(4-sulfophenil)-2H-tetrazolium] et PMS (phenazine metasulphate). Ce test est commercialisé par la société Proméga et est présenté comme un test de quantification de la prolifération cellulaire. Le MTS (coloration jaune) en présence de PMS (transfert d'électron) est réduit par les cellules en formazan (coloration rouge) qui est soluble dans le milieu de culture. L'absorbance du formazan est lue au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 490nm et est proportionnelle au nombre de cellules en division.

Les souches bactériennes employées ont été les souches sauvages LGP 32, LMG 20012T et leurs mutants respectifs TR 32-GFP et LMG 20012T GFP qui portent une insertion de deux gènes, l'un codant pour la résistance à un antibiotique, le chloramphénicol, l'autre codant une protéine fluoresente permettant le marquage de la bactérie, la GFP ou Green Fluorescent Protein, et facilitant sa détection (fig 2c). L'utilisation de souches mutées résistantes au chloramphénicol permet de traiter l'hémolymphe afin de tuer les bactéries de la flore bactérienne normale et de s'assurer que le développement bactérien observé est dû aux seules souches *Vibrio splendidus* ajoutées à l'hémolymphe.



Fig. 1a: Région de Florianópolis /SC - Brésil

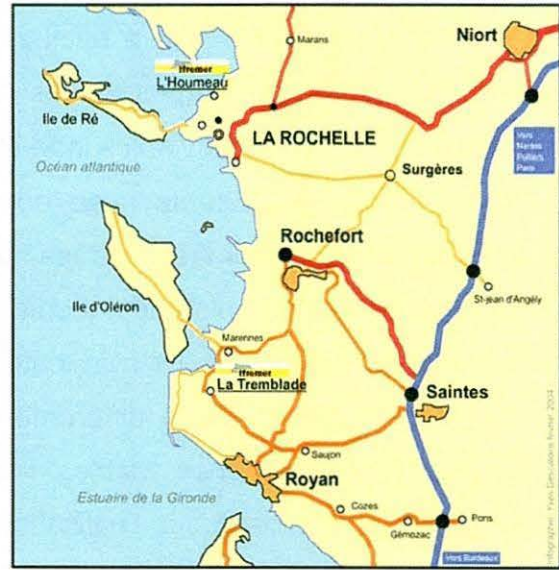


Fig. 1b: Région de Marennes-Oléron - France

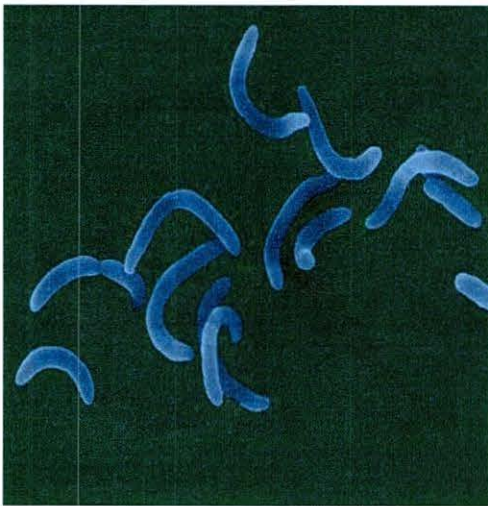


Fig. 2a: *Vibrio* sp.

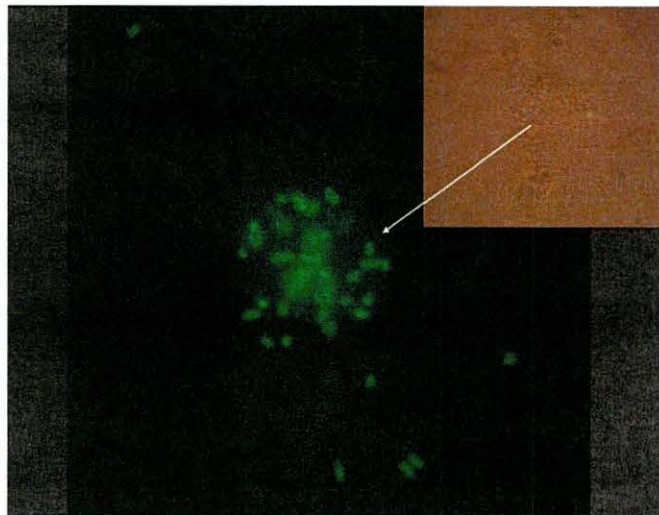


Fig. 2c: Visualisation de *V. Splendidus* associés à un hémocyte

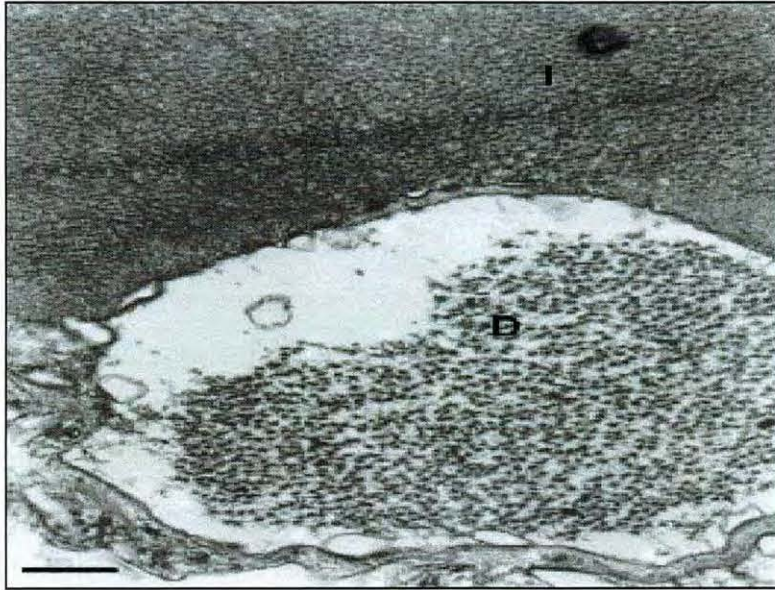


Fig. 2b: Cellule musculaire de *C. gigas* avec myofibrilles normales (I) et altérées (D) par l'infection à *V. splendidus* (microscopie électronique)

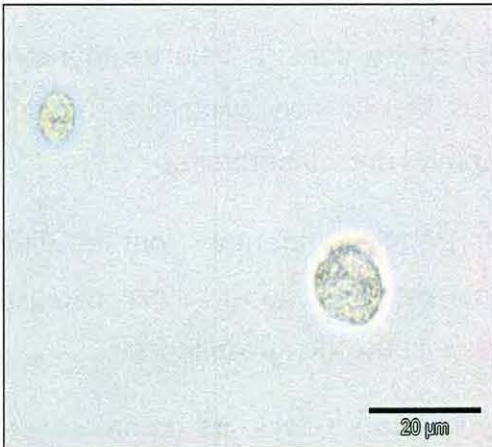


Fig. 3a: Observation au microscope des hémocytes

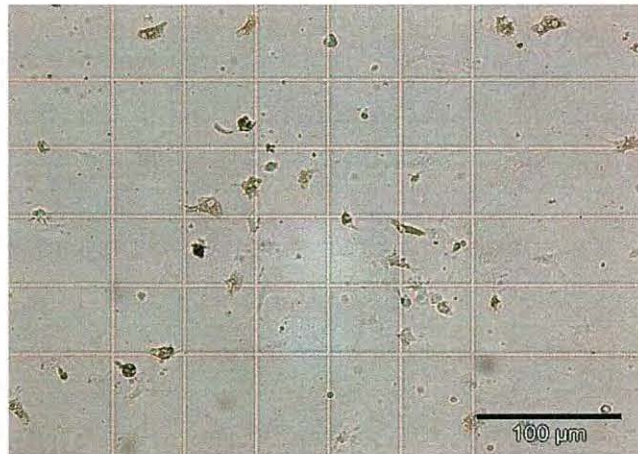


Fig. 3b: échantillon d'hémolymphe de *C. gigas* observé au microscope sur cellule de Malassez

2. Description de l'Entreprise

L'Institut Français de Recherche pour L'Exploitation de la Mer (Ifremer) est un établissement public responsable par le soutien technique à l'aquaculture et pêche maritime. Il a été créé par un décret au 5 juin 1984 à partir de la fusion du Centre National d'Exploitation pour les Océans (CNEXO) et l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes (ISTPM). Il dépend de plusieurs Ministères: Recherche, Agriculture et Pêche, Équipement, Transports et Logement. Ses champs de recherche sont très larges, du développement technologique pour une meilleure connaissance des océans à l'exploitation des ressources marines en passant par la mise en place de réseaux de surveillance de la qualité du milieu marin et du statut zoosanitaire des mollusques d'élevage. En dehors de ses multiples implantations le long du littoral français sur les côtes atlantique et méditerranéenne, l'Ifremer est également présent à l'outre mer en Guyane, aux Antilles, à Saint Pierre et Miquelon, à la Réunion ainsi qu'en Polynésie française, en Nouvelle Calédonie et à Tahiti (fig. 4a).

La Station de La Tremblade (fig. 4b) est située dans la baie de Marennes-Oléron et est spécialisée dans les domaines de la conchyliculture et de la surveillance de l'environnement littoral. Elle comprend deux laboratoires :

-Le Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais dont les études portent sur l'environnement littoral et sur les espèces de bivalves exploitées (principalement huîtres et moules) et qui gère des réseaux de surveillance.

-Le Laboratoire Génétique et Pathologie (LGP) spécialisé dans les domaines de la génétique et de la pathologie des invertébrés marins et plus spécifiquement des mollusques bivalves. Les principaux objectifs du laboratoire, visent essentiellement à développer des recherches chez les mollusques bivalves marins dans les domaines **1) de la pathologie** : surveillance des ressources conchylicoles, identification des agents pathogènes, description de leur cycle de développement, mise au point des techniques de reproduction expérimentale des maladies, développement d'outils performants de diagnostic utilisables à des fins de recherche ou de contrôle, étude de l'impact de ces maladies et de leur évolution géographique et temporelle, gestion du

réseau de surveillance en pathologie des mollusques (Repamo), Laboratoire Communautaire de Référence (LCR) pour l'Union Européenne et laboratoire de référence pour l'OIE (Office International des Epizooties) et **2) de la génétique** : étude des ressources génétiques, testage de nouvelles espèces, de nouvelles populations et d'hybrides pour limiter les risques liés à la monoculture. Obtention de souches résistantes ou tolérantes aux maladies pour essayer d'apporter des réponses aux épizooties qui remettent en cause les productions. Création de souches ou de lignées présentant de meilleures performances de croissance, de qualité de chair, une meilleure adaptation aux conditions de milieu d'élevage ou éventuellement de faibles besoins métaboliques, pour améliorer la productivité des entreprises.

Son infrastructure est divisée en deux bâtiments où travaillent 50 employés en dehors des stagiaires temporaires. Le premier bâtiment est constitué de six laboratoires contenant des ultra-centrifugeuses, un automate à inclusion et plusieurs microtomes pour l'histologie, une hotte à culture cellulaire, un cytomètre de flux, un séquenceur à quatre capillaires, plusieurs thermocycleurs pour PCR un appareil à PCR quantitative. Il contient également une salle de manipulation des radioéléments, une salle pour la microscopie électronique à transmission, une salle de rangement des produits, une laverie, huit bureaux, une salle de réunion et une bibliothèque. Le deuxième bâtiment a huit salles humides comprenant notamment un conservatoire pour les espèces de mollusques exotiques, une micronurserie, un salle de maturation (fig. 4c), deux salles d'élevage larvaire, une salle d'infection expérimentale contrôlée avec traitement des effluents, une salle de production de phytoplancton, un laboratoire de biométrie, une salle informatique, un laboratoire de bactériologie (fig. 4d), 20 bureaux et huit annexes techniques (local des pompes, local de l'ozoneur pour le traitement des eaux de rejet, local du transformateur électrique et de l'onduleur, local de compresseurs et commandes électriques, chaufferie, groupe électrogène, garage, atelier). Le circuit hydraulique se compose de: quatre bassins de 300m³ de réserve d'eau de mer, 23 pompes de 10 à 300m³/h, une station de

stérilisation à l'ozone des eaux de rejet et quatre bassins de 20m³ pour la production en masse de phytoplancton.



Fig. 4b: Ifremer – Station La Tremblade

Fig 4a: implantations de l'Ifremer



Fig. 4c: bassins de stabulation

Fig 4a: Laboratoire de bactériologie

3. Matériels et Méthodes

3.1) Infection expérimentale d'huîtres *Crassostrea gigas* avec *Vibrio splendidus*

Des huîtres de petite taille (fig. 5a) âgées d'un an environ ont été injectées avec deux souches de bactérie appartenant à l'espèce *V. splendidus* (LGP 32 et LMG 20012T respectivement) afin d'évaluer leur pouvoir pathogène.

Chaque animal a été infecté avec $2 \cdot 10^9$ UFC à raison de 100 μ l injectés à l'aide d'une seringue dans le muscle adducteur des huîtres préalablement anesthésiées dans une solution de chlorure de magnésium (fig. 5b). Un total de 40 animaux a été infecté avec chacune des deux souches. Ces animaux ont ensuite été transférés dans des aquariums de 2L remplis avec de l'eau de mer filtrée à 1 μ m; à une densité de 20 animaux /aquarium. Les mortalités ont été relevées deux fois par jour pendant trois jours et les résultats exprimés en % de mortalités cumulées. A titre de témoin négatif des animaux ont été injectés avec l'eau de mer artificielle (EMA) ne contenant pas de bactéries (annexe 8.1.3).



Fig. 5a: Anesthésie des huîtres avant infection



Fig. 5b: infection expérimentale des huîtres

3.2) Evaluation de la sensibilité du test de quantification colorimétrique des bactéries *V. splendidus* cultivées *in vitro*

Des bouillons bactériens correspondant aux souches LMG 20012T, LGP 32 et TR 32 ont été préparés. Pour cela un tube rempli avec 10mL de milieu Zobell (annexe 8.1.1) liquide stérile additionné de chloramphénicol à la concentration finale de 12,5 μ g /mL (dans le cas de la souche mutante TR32) ou non, a été inoculé avec

trois colonies préalablement cultivées sur boîte de Petri remplies de milieu Zobell solide. Après une incubation à 20°C des tubes, sous agitation, pendant une nuit, la concentration bactérienne de chaque bouillon bactérien a été évaluée par la technique de dilution successive et étalement sur boîte de Petri d'une suspension bactérienne. Après incubation à 20°C des boîtes de Petri pendant 24 heures, les colonies ont été dénombrées et la concentration en bactérie cultivable du bouillon de départ calculée en prenant en compte le facteur de dilution utilisé.

La concentration bactérienne théorique de chaque bouillon a été estimée à $2 \cdot 10^9$ UFC/ml et des dilutions successives de 10 en 10 (100µl de suspension bactérienne dans 900µl d'EMA) effectués jusqu'à obtenir une concentration théorique de $2 \cdot 10^2$ bactéries/mL.

Cent microlitres de milieu Zobell liquide ont été ajoutés dans chaque puits d'une microplaque pour culture cellulaire composée de 8 lignes et 12 colonnes (fig. 6b). Cinquante microlitres de chacune des dilutions de suspension bactériennes préparées dans le paragraphe précédent ont été ensuite rajoutés dans les 7 premières lignes en réalisant des duplicats. Les suspensions bactériennes ont été remplacées par du milieu Zobell stérile dans la dernière ligne afin d'évaluer le bruit de fond lié à la technique. Différents temps d'incubation des microplaques, placées à la température du laboratoire (20°C) et sous agitation, ont été testés. Ces différents temps d'incubation des bactéries sont représentés par chacune des colonnes de la microplaque. Après préparation extemporanée d'une solution contenant 20ml de MTS à 2mg/ml et 1ml de PMS à 0.92mg/ml, 50µl de cette solution sont ajoutés dans chaque puits à l'issue de chaque temps d'incubation des suspensions bactériennes (deux colonnes concernées), à une heure d'intervalle. Les microplaques sont incubées à température ambiante, sous agitation horizontale et à 400 rpm pendant toute la durée du test. Elles sont ensuite analysées au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 492nm à intervalle régulier de 30 minutes afin de mesurer la densité optique de chaque échantillon.

Afin d'évaluer la croissance bactérienne en microplaque, une autre microplaque (annexe 8.2.2), contenant les échantillons correspondant aux concentrations

théoriques de $2 \cdot 10^3$ bactéries /mL et $2 \cdot 10^2$ bactéries/mL, a été préparée. La croissance bactérienne a été évaluée en étalant, pour chaque temps d'incubation considéré, 50 μ l de suspension bactérienne sur une boîte de Petri (fig. 6c). Du fait de la prolifération rapide des Vibrio en milieu de culture, une dilution au $10^{\text{ème}}$ de la dilution « $2 \cdot 10^2$ bactéries/mL » a dû être effectuée après 3, 4 ou 5 heures d'incubation de la microplaque afin de rendre possible le dénombrement des colonies obtenues sur boîte de Petri et permettre le calcul de la concentration bactérienne réelle présente dans l'échantillon. De même après 6 heures de culture une nouvelle dilution, au $100^{\text{ème}}$ de la dilution « $2 \cdot 10^2$ bactéries/mL », a été effectuée pour les mêmes raisons que précédemment.



Fig. 6a: incubateur à 20°C avec agitateur rotatif



Fig. 6b: remplissage des solutions dans la micro-plaque

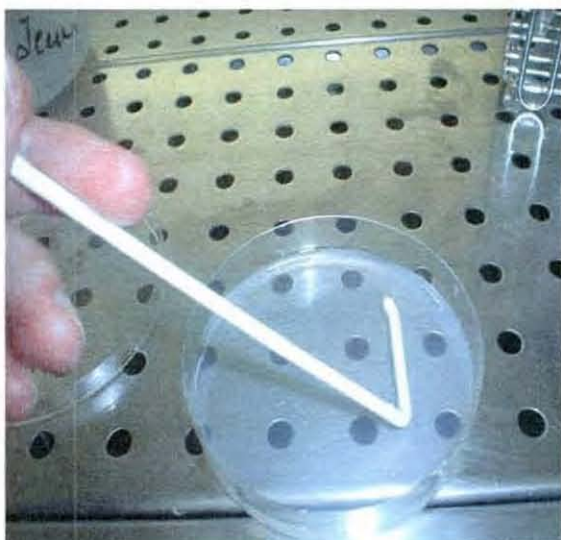


Fig. 6c: Etalement d'un inoculum pour dénombrement bactérien Fig. 6d: application des réactifs MTS/PMS

3.3) Testage des concentrations optimales d'utilisation du chloramphénicol en microplaques

Du fait de l'observation d'une inhibition de la croissance bactérienne en microplaques lorsque le chloramphénicol était utilisé à la même concentration que celle employée lors des cultures en tube de 10 ml (12.5 µg/ml final), il a été décidé de tester si le changement de mode de culture (microplaque versus tubes Greiner de 10 ml) ou le type d'agitation (horizontal versus rotatif) avait une action sur la tolérance des souches mutantes à cet antibiotique. Pour cela, une microplaque a été préparée en la remplissant avec 100µL de Zobell stérile par puits contenant différentes concentrations de chloramphénicol diluées de deux en deux (8 µg /mL à 0,06µg /mL) selon le schéma de plaque représenté en annexe 8.2.3. Cinquante microlitres de différentes concentrations en bactéries TR 32 (2×10^1 CFU /mL à 2×10^6 CFU /mL) ont été ensuite ajoutés. Après une nuit d'incubation à 15°C des bactéries sous agitation horizontale, 50 µl de MTS/PMS ont été ajoutés à chaque puits et la microplaque incubée à température ambiante. La croissance bactérienne a été quantifiée par lecture au spectrophotomètre de la microplaque.

3.4) Test d'interaction hémocytes - vibrions

La souche mutée TR32 a été cultivée en présence de chloramphénicol la veille du test de phagocytose, en préparant un tube avec 10mL de Zobell additionné de chloramphénicol (12,5µg /mL finale) inoculé à partir de colonies de cette souche préalablement cultivée sur boîte de Petri en milieu Zobell - Agar. Le lendemain, la suspension bactérienne est centrifugée à 3202 g pendant 10 minutes, le surnageant est jeté afin de se débarrasser du milieu de culture, et les cellules remises en suspension avec 10mL d'EMA. Des dilutions de dix en dix sont ensuite préparées par dilution des bactéries dans de l'EMA de façon à obtenir 2×10^9 CFU /mL à 2×10^2 CFU /mL théorique.

L'hémolymphe a été collectée à l'aide d'une seringue au niveau du sinus du muscle adducteur de 13 animaux triploïdes de *C. gigas* âgés de 18 mois (fig. 7a). Les prélèvements ont ensuite été mélangés de façon à obtenir au moins 8mL d'hémolymphe selon la méthode décrite par Volety et al. (1999). La concentration hémocytaire a été déterminée par comptage sur cellule de Malassez (fig3b) puis a été ajustée à 5×10^5 CFU /mL par dilution dans de l'EMA. Le choix d'animaux triploïdes réputés stériles permettait de limiter les risques de contamination des prélèvements par les gamètes. Quatre tubes Eppendorf (2,0mL) contenant 2 mL de d'hémolymphe ont été préparés. Au temps T0 de contact entre hémocytes et vibrions, 50 µL de suspension bactérienne à 2×10^6 CFU /mL, 2×10^7 CFU /mL et 2×10^8 CFU /mL ont été respectivement ajoutés dans le premier tube (A), le deuxième tube (B), puis le troisième tube (C). Seuls 50 µl d'EMA ont été ajoutés dans le dernier tube témoin (D). Les concentrations bactériennes utilisées permettent d'obtenir un ratio : nombre de vibrions / nombre d'hémocytes, de 0,1 (pour le tube A); 1 (B); 10 (C); 0 (D). Différents temps de contact hémocytes/vibrions : T1 = 0,5h, T2 = 1h, T3 = 2h, T4 = 3h, T5 = 4h, T6 = 5h ont été testés puis les échantillons sont traités selon le protocole décrit dans la figure 8. Les échantillons sont incubés à température ambiante (20°C) sous agitation (fig. 7b).

Cinquante µl de plasma ou de suspension hémocytaire sont ajoutés dans les puits de la microplaque qui est ensuite incubée sous agitation horizontale à 15°C pendant une nuit. Le lendemain matin la solution de MTS/PMS est ajoutée

(50µl/puits) lorsque la sensibilité du test colorimétrique donne les résultats de sensibilité escomptés (fig. 7d) sur une microplaque ne contenant que des suspensions bactériennes préparées la veille par dilution de dix en dix avec de l'EMA (annexe 8.2.4).

Fig. 8: Protocole d'évaluation de la phagocytose

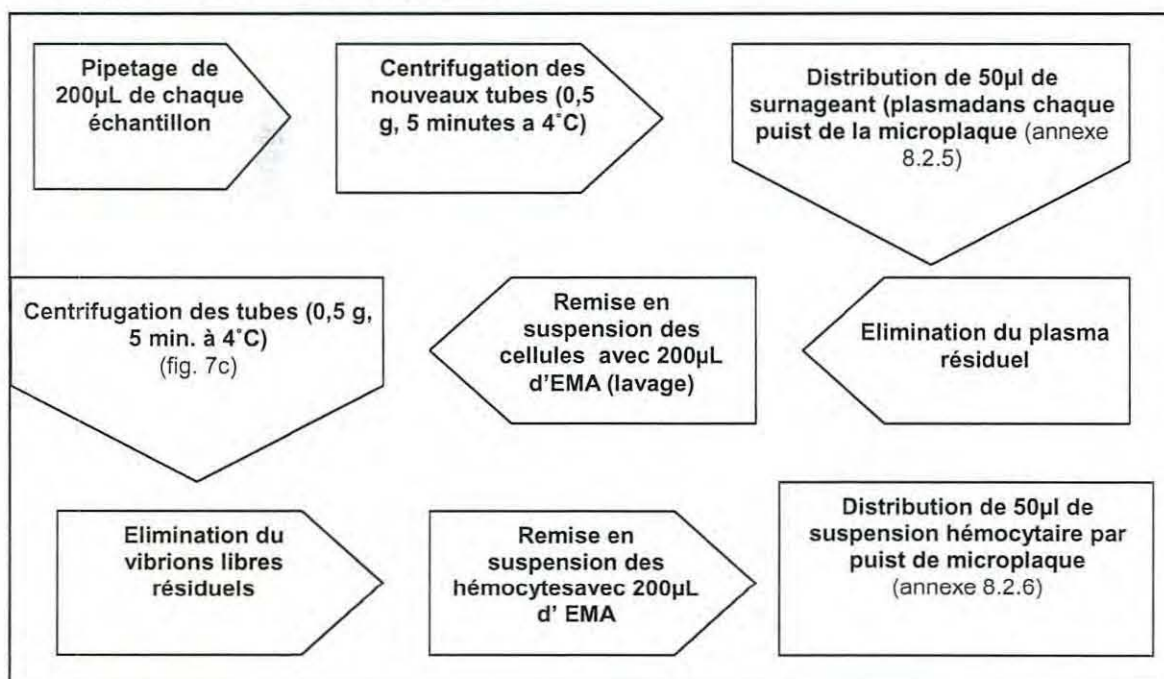




Fig. 7a: Huîtres creuses triploïdes expérimentales



Fig. 7b: Agitateur horizontal pour microplaques



Fig. 7c: Centrifugeuse pour tubes Eppendorf de 1,5mL



Fig. 7d: Spectrophotomètre

4. Resultats

4.1) Mortalités de *Crassostrea gigas* infectées expérimentalement avec *V. splendidus*

Après 72 heures de contact avec la souche LGP 32, les animaux testés ont présenté une mortalité de 45%. Comme attendu, la souche LMG 20012T et le témoin (injection d'EMA) n'ont présenté aucune mortalité significative (graph. 1).

4.2) Sensibilité du test de quantification colorimétrique de *V. splendidus*

4.2.1) Cas de la souche LGP 32

L'ajout du réactif MTS/PMS après une heure seulement d'incubation est inefficace puisque l'on observe une DO proche du bruit de fond ($DO=0,08$) pour toutes les concentrations bactériennes testées (graph. 2a). Après deux heures d'incubation le test colorimétrique est capable de détecter une concentration de 5×10^6 CFU /mL avec une valeur de DO significative de 0,38. Après 4 heures d'incubation la

sensibilité du test augmente avec un seuil de détection à 5×10^5 CFU /mL. A 5 heures d'incubation, une concentration de 5×10^4 CFU /mL est détectable avec une DO de 0,25. Enfin à 6 heures d'incubation, le test détecte une concentration initiale de 5×10^3 CFU /mL (DO de 0,20).

Si l'on augmente le temps d'incubation des bactéries en présence de MTS/PMS à 90 minutes au lieu de 30 min. comme précédemment (fig. 9a), on observe une augmentation des valeurs de DO sans que la sensibilité du test (seuil de concentration bactérienne détectée) soit améliorée (graph. 2b).

4.2.2) Cas de la souche LMG 20012T

Contrairement à la souche LGP32, la souche LMG20012, apparentée à *V. splendidus* également, présente une moins grande sensibilité au test de quantification colorimétrique (graph. 3a). En effet ce n'est qu'après seulement quatre heures d'incubation qu'une valeur significative de DO est obtenue (0,22) correspondant à une concentration de 5×10^6 CFU /mL initiale. Après 6 heures d'incubation le seuil de détection de la technique est limité à la concentration de 5×10^5 CFU /mL soit 0,34 de DO.

Comme observé avec la souche LGP 32, un temps prolongé en présence de MTS/PMS (90 minutes) permet d'observer une augmentation significative des DO pour une concentration bactérienne donnée (graph. 3b). Cependant, comme précédemment, le seuil de détection n'est pas amélioré avec seulement 5×10^5 CFU /mL détectables (DO de 0,34) après 5 heures d'incubation.

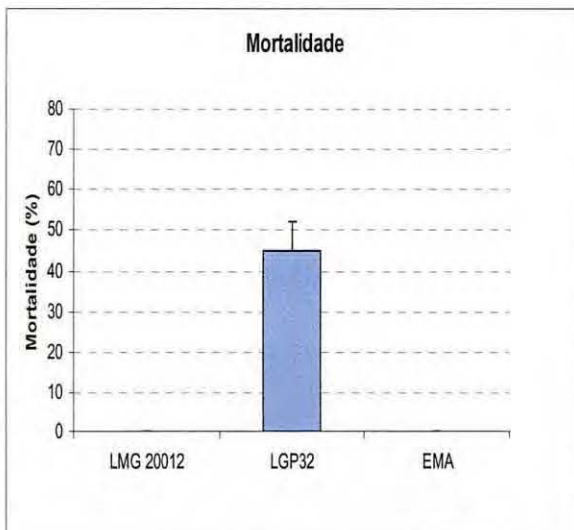
4.2.3) Cas de la souche TR 32

Les courbes de croissances avec la souche mutée sont d'une façon générale plus lente que celles obtenues avec la souches sauvage LGP32 et ce quelque soit le temps d'incubation considéré, après une lecture de la microplaque à 30 minutes (graph. 4a).

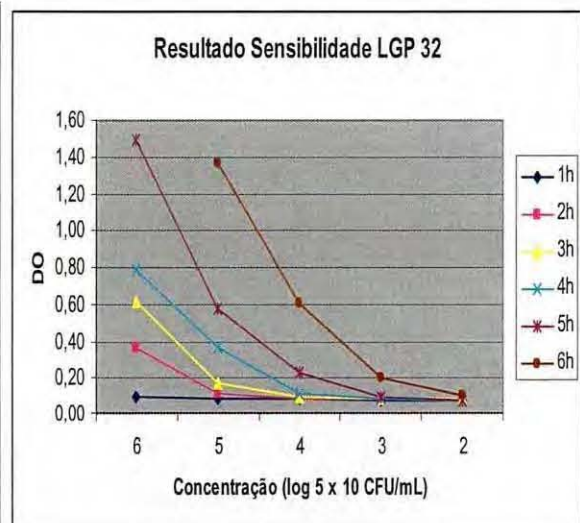
Après 90 minutes de révélation colorimétrique (fig. 9c), les DO aux diverses concentrations bactériennes sont significativement plus (graph. 4b). Le seuil de

sensibilité du test est de 5×10^4 CFU /mL après 5h d'incubation de la microplaque de avec un DO de 0,54.

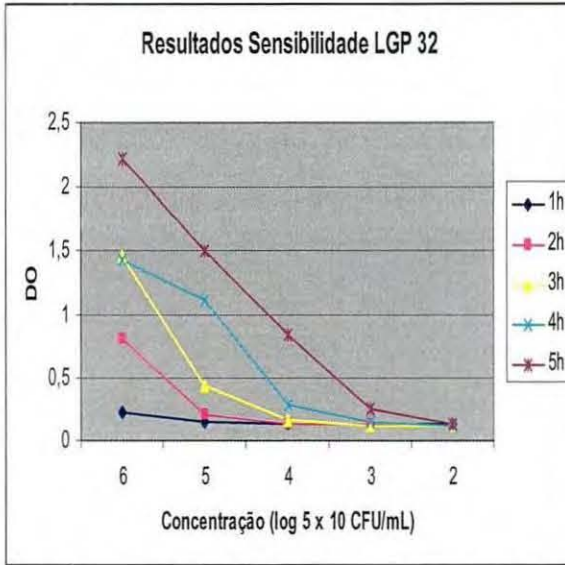
Du fait d'une croissance ralentie de TR32 par rapport à LGP32, une lecture après 24h de révélation colorimétrique de la microplaque a été effectuée (fig. 9d, graph. 4c). La sensibilité du test est significativement augmentée puisqu'il est possible de détecter seulement 5×10^2 CFU /mL après 5h (DO de 0,82) ou 6 heures (DO de 1,22) d'incubation initiale des bactéries en milieu Zobell.



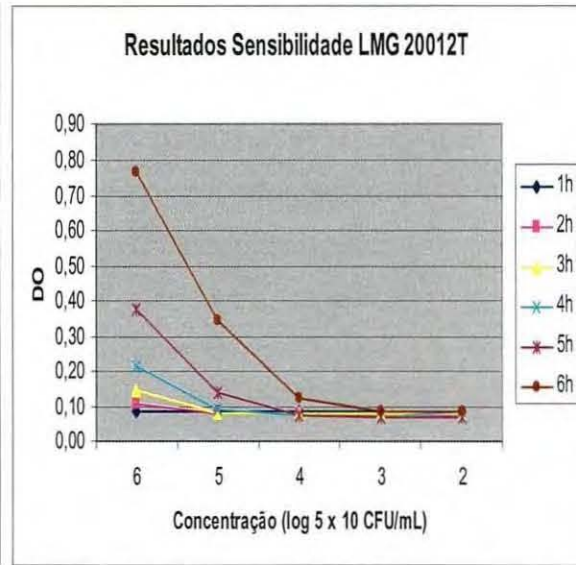
Graph. 1: Mortalidades cumuladas após 3 dias de infecção.



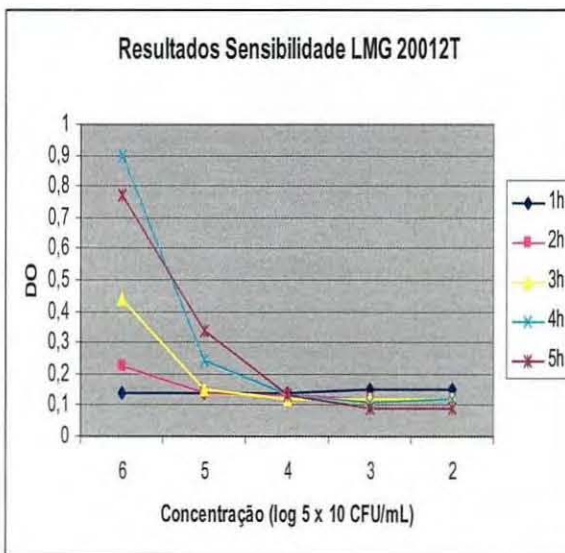
Graph. 2a: Desenvolvimento colorimétrico de LGP 32 segundo o tempo de incubação e a concentração bacteriana utilizados. A leitura da placa foi realizada após 30 minutos de MTS/PMS



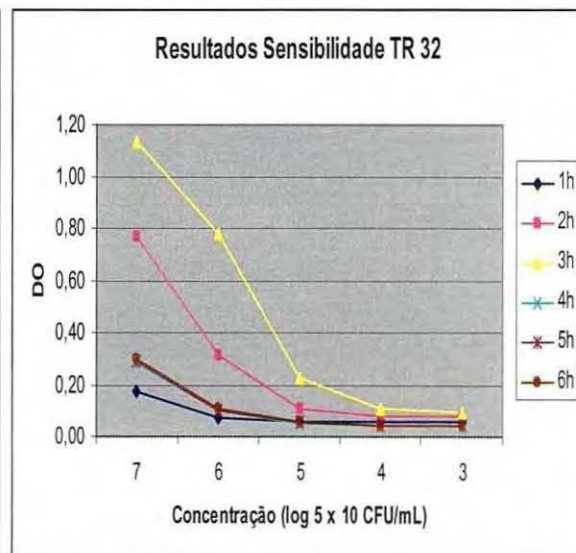
Graph. 2b: LGP 32 après 90 minutes de MTS/PMS



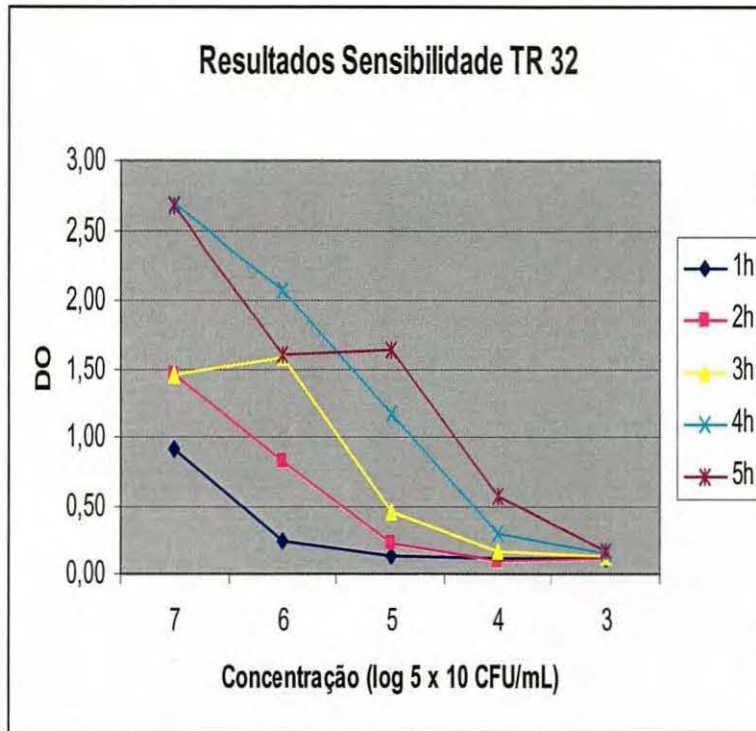
Graph. 3a: LMG 20012T après 30 minutes de MTS/PMS



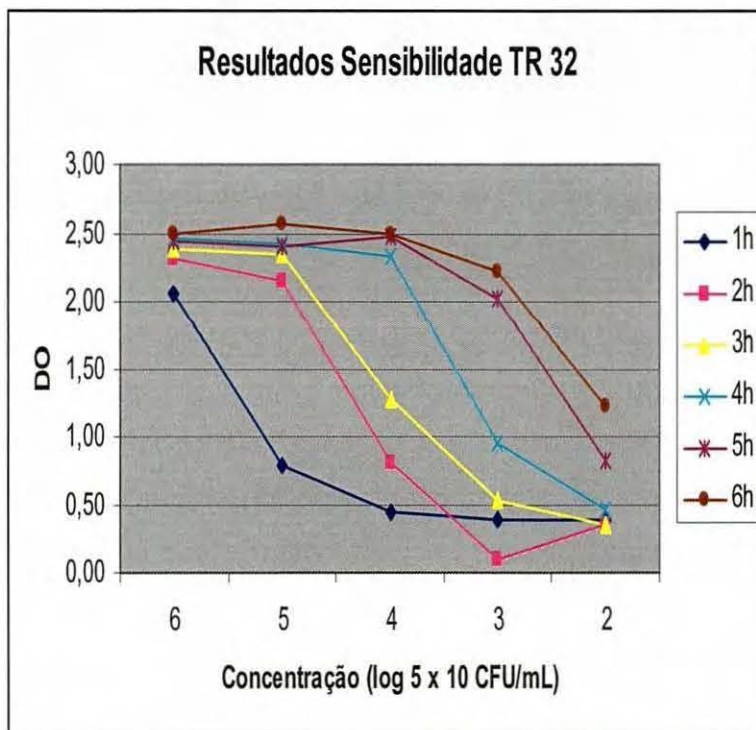
Graph. 3b: LMG 20012T après 90 MTS/MTS



Graph. 4a: TR 32 après 30 minutes de MTS/PMS



Graph. 4b: TR 32 après 90 minutes de MTS/PMS



Graph. 4c: TR 32 après 24 heures de MTS/PMS

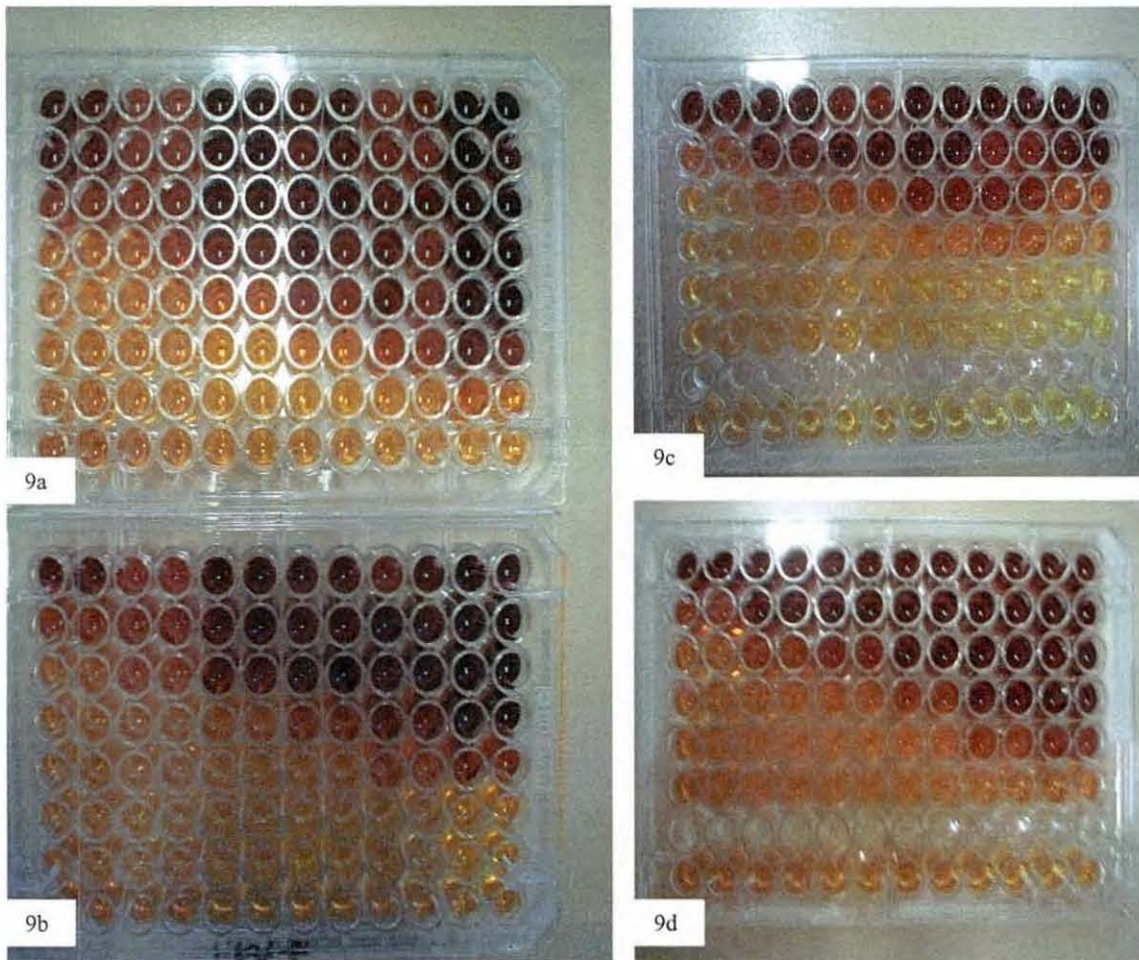
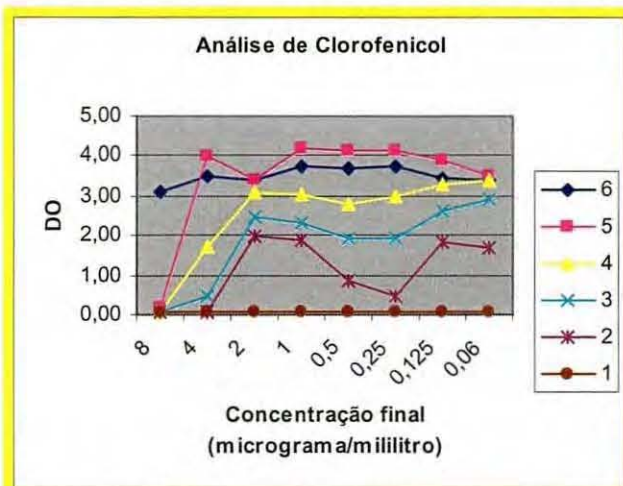


Fig. 9a: Développement colorimétrique de LGP 32 après 90 minutes d'incubation en présence MTS/PMS. Fig. 9b: Développement colorimétrique de LMG 20012T à 90 minutes. Fig. 9c: Développement colorimétrique de TR 32 à 90 minutes. Fig. 9d: développement colorimétrique de TR 32 à 24 heures.

4.3) Effet bactériostatique du chloramphénicol en microplaque

De façon inattendue, le chloramphénicol présente une activité bactériostatique en microplaque pour TR32 lorsqu'il est utilisé à la concentration finale de $8\mu\text{g/mL}$ (graph. 5, fig. 10) alors qu'une concentration de $12,5\mu\text{g/ml}$ n'empêche pas la croissance de cette bactérie lorsque la culture est réalisée en tube Greiner de 10 ml et sous agitation rotative. A la concentration finale de $4\mu\text{g/mL}$ une croissance de TR32 est observée mais celle ci est tout de même significativement ralentie par rapport aux courbes de croissance obtenues avec des doses inférieures à cette valeur (2 à $0,006\mu\text{g/ml}$ finale). Aux concentrations de $2\mu\text{g/mL}$ ou inférieures testées

(1µg/mL, 0,5µg/mL, 0,25µg/mL, 0,125µg/mL et 0,06µg/mL) on n'observe plus d'effet bactériostatique du chloramphénicol et ce quelque soit la concentration bactérienne utilisée. Une diminution des valeurs de DO est néanmoins observée pour la courbe de croissance obtenue avec la concentration bactérienne de 2×10^2 CFU /mL aux doses 0,5 et 0,25 µg/ml de chloramphénicol. Il est probable que ces valeurs anormalement basses de DO s'expliquent par des erreurs de pipetage.



Graph. 5: Effet du chloramphénicol sur la croissance de TR32 après 16 h d'incubation à 15°C, selon la concentration

Fig. 10 : Développement colorimétrique de la microplaque ayant fourni les données du graphe 5

bactérienne initiale utilisée : 6 = 2×10^6 CFU/mL ;
 5 = 2×10^5 CFU/mL; 4 = 2×10^4 CFU/mL; 3 = 2×10^3 CFU/mL;
 2 = 2×10^2 CFU/mL; 1 = 2×10^1 CFU/mL).

4.4) Quantification des bactéries viables intra et extra (plasma) hémocytaire en fonction du temps de contact entre les *Vibrio* (souche TR32) et l'hémolymphe

Une micro-plaque ne contenant que la bactérie TR32 (fig. 11a) a été préparé en même temps que les autres microplaques permettant l'évaluation du nombre de bactéries viables intra et extra (plasma) hémocytaires lors des essais de mise en contact de cette bactérie avec l'hémolymphe d'huîtres triploïdes.

Le temps d'incubation nécessaire à une bonne croissance bactérienne et sensibilité du test ont été évalués en ajoutant le MTS/PMS à différents temps. Au temps T3 (lignes 5 e 6), la sensibilité du test est satisfaisante puisque 2×10^2 CFU /mL sont détectables par le test colorimétrique. On observe de plus une relation quasi linéaire entre l'intensité de la réaction colorimétrique (DO) et la concentration bactérienne

initiale utilisée. Ce temps (T3) a donc été choisi afin de procéder au développement colorimétrique des autres microplaques permettant de quantifier les interactions hémocytes / Vibrio.

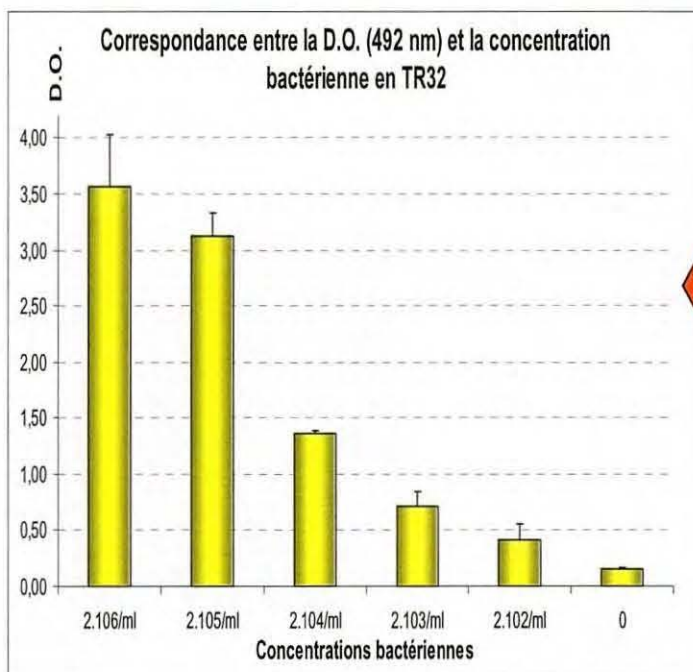
L'analyse de la microplaque contenant les extraits de plasma (graph. 6b, fig.11b), selon différentes conditions de mise en contact entre Vibrio et hémocytes (ratio nombre de Vibrio : nombre d'hémocytes), révèle :

- Un nombre d'autant plus élevé de bactéries TR32 libres présentes dans le plasma que le ratio est élevé quelque soit le temps de contact entre les Vibrio et l'hémolymphe.
- Une décroissance rapide du nombre de Vibrio retrouvé dans le plasma, significative pour le ratio $R=1$, à l'issue de deux heures de mise en contact à température ambiante (20°C) des bactéries avec l'hémolymphe des huîtres. Ainsi après 2 heures de contact la concentration des bactéries retrouvées dans le plasma est quasi nulle, non significativement différente des extraits plasmatiques provenant d'hémolymphe non traité avec les Vibrio ($R=0$).
- La présence de bactéries TR32 libres plasmatiques en nombre élevé quel que soit le temps de contact hémolymphe/Vibrio considéré lorsque le ratio R est égal à 10. On observe de plus une fluctuation au cours du temps des concentrations en TR32 présents dans le plasma.

L'analyse de la microplaque contenant les extraits hémocytaires (graph. 6c, fig. 11c) révèle un profil similaire aux extraits plasmatiques :

- Quelque soit le temps de contact, le nombre de bactéries viables intra hémocytaire est d'autant plus important que le ratio R est grand.
- Pour les ratio $R=0,1$ et $R=1$, on observe une décroissance régulière du nombre de bactéries viables intra hémocytaire en fonction du temps de contact. Cette décroissance est cependant plus lente qu'avec les extraits plasmatiques. On note en effet une disparition quasi totale du nombre de bactéries viables intra hémocytaires 5 heures après le contact entre les Vibrio et l'hémolymphe. Les valeurs de DO obtenues à ce temps ne sont pas significativement différentes de celle obtenue avec l'hémolymphe non traité avec les Vibrio.

- De façon similaire aux extraits plasmatiques, l'analyse des résultats pour le ratio $R=10$ révèle un nombre important de bactéries viables intra hémocytaires quel que soit le temps de contact considéré, fluctuant au cours du temps.



Graph. 6a: développement colorimétrique en fonction de la concentration bactérienne initiale utilisée

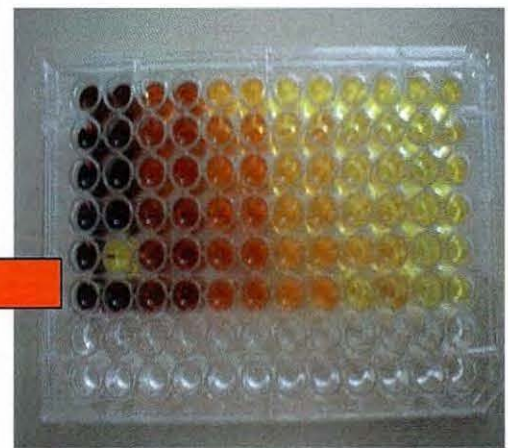
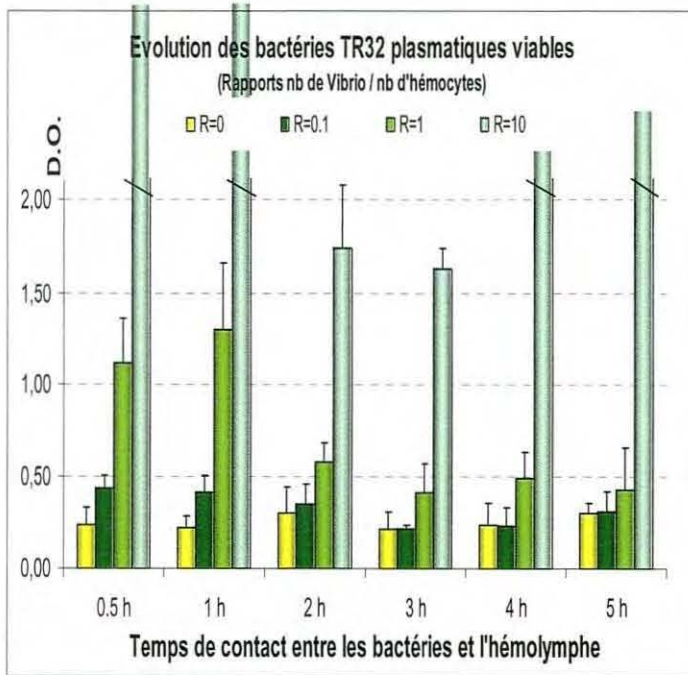
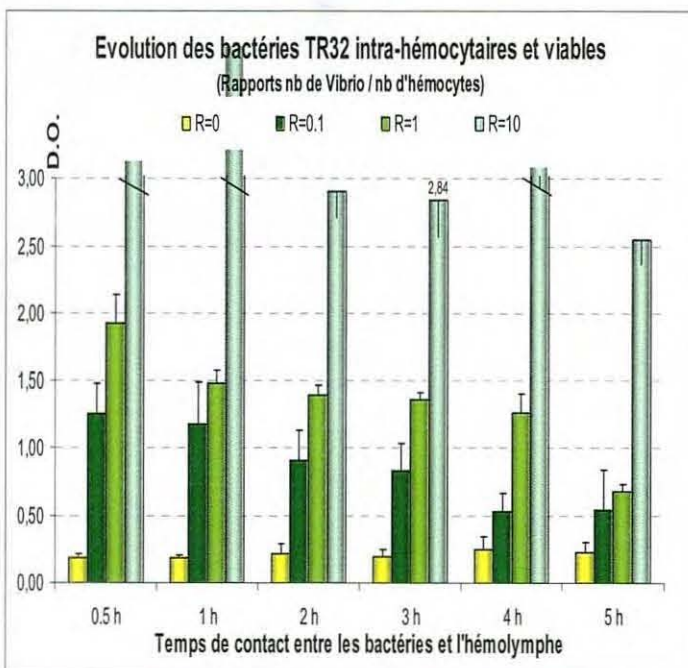


Fig. 11a: Recherche du temps d'incubation optimal pour avant utilisation du test colorimétrique



Graph. 6b: Quantification des bactéries présentes dans le plasma



Graph. 6c: Quantification des bactéries intra hémocytaires

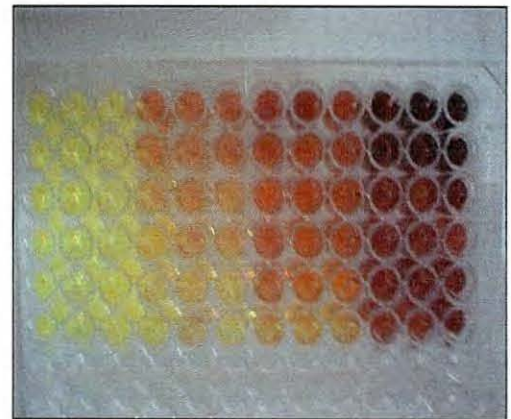


Fig. 11b: Développement colorimétrique des extraits plasmatiques après 3 heures d'incubation avec MTS/PMS

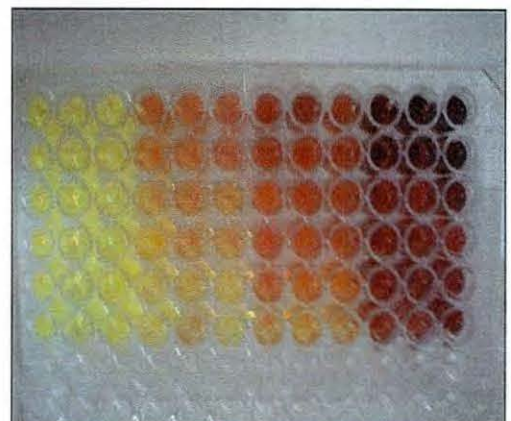


Fig. 11c: Développement colorimétrique des extraits hémocytaires après 3 heures d'incubation avec MTS/PMS

5. Discussion

La technique classique d'étalement sur boîte nutritive pour la détermination d'une concentration bactérienne (nombre d'Unités Formant des Colonies UFC) est une technique dispendieuse en temps. Aussi nous avons préféré mettre au point une technique de quantification colorimétrique permettant d'étudier simultanément plusieurs facteurs : différents rapports de concentration entre hémocytes et vibrions, différents temps de contact hémocytes-vibrio, comportement différentiel des souches vis à vis de la phagocytose.

Différents essais de culture en microplaque ont été réalisés qui se sont révélés être concluants et ont permis *in fine* la mise au point d'un test de quantification basé sur l'utilisation des substrats MTS et PMS comme indicateurs de prolifération bactérienne et par conséquent de densité bactérienne présente dans un échantillon. Les tests de quantification des bactéries seules cultivées sur microplaque (LGP32, TR32 et LMG20012) ont pu être réalisés sur une seule journée et la sensibilité du test colorimétrique évaluée pour chacune de ces souches. Des différences notables de vitesse de croissance ont pu être observées selon les souches considérées qui ont nécessité différents temps d'incubation afin que le test colorimétrique puisse présenter une bonne sensibilité : détection d'échantillons contenant des bactéries à la concentration de 10^2 à 10^3 UFC/ml. Par ordre de vitesse de croissance décroissant on trouve la souche LGP 32 sauvage, la souche TR32 mutée et la souche avirulente LMG20012. La moindre croissance de TR32 peut s'expliquer par le fait que cette bactérie, LGP32 à l'origine, a été mutée en lui intégrant deux gènes, l'un responsable de la résistance au chloramphénicol et l'autre de la production d'une protéine fluorescente, la GFP, ce qui a pu affecter sa physiologie et donc son potentiel de croissance. La souche avirulente LMG 20012T a été isolée quant à elle de saumon à Tasmanie (Australie) et non d'huîtres creuses. Il est possible que son optimum de croissance soit à une autre température que celles utilisées (15°C ou 20°C) ou que les conditions de culture en milieu artificiel de Zobell soient moins adaptées à sa physiologie.

L'utilisation de bactéries mutantes résistantes au chloramphénicol (TR32) a permis l'étude de la viabilité des bactéries mises en contact *in vitro* avec l'hémolymphe, en tuant toutes les bactéries de la flore normale de l'hémolymphe et en assurant ainsi la spécificité des interactions hémocytes *Vibrio* observées. Cependant nous avons dû au préalable ajuster la concentration en chloramphénicol à nos essais de culture en microplaque car la concentration habituellement utilisée en culture en tube s'est révélée avoir un effet bactériostatique en microplaque. Cet effet bactériostatique peut être attribué au changement du support (microplaque versus tube) et aux conditions d'agitation (horizontal versus rotatif). Nos expérimentations ont permis d'établir qu'une concentration de chloramphénicol à 2 µg /mL finale permettait d'assurer la croissance de la souche TR32 tout en étant efficace vis à vis de la flore bactérienne normale de l'hémolymphe.

Les différents essais de mise au point du test de quantification des bactéries intra et extra (plasma) hémocytaires réalisés au cours de ce stage nous ont amené à étaler le test sur deux jours afin d'assurer une bonne croissance des bactéries et permettre d'obtenir une bonne sensibilité du test colorimétrique. Les différents extraits bactériens (plasma ou hémocytes) ont été incubés à 15°C sur la nuit et non à 20°C afin de permettre une croissance bactérienne modérée, de ne pas prendre le risque de saturer le test de quantification des bactéries mis au point et de disposer du temps nécessaire pour l'incubation des plaques en présence de MTS/PMS et la lecture au spectrophotomètre des microplaques.

L'étude des interactions entre hémocyte et *Vibrio* a montré que pour des ratio égal à 1 ou 0,1 la bactérie TR32 présente dans le plasma était rapidement adsorbée et/ou phagocytée par les hémocytes, dans les deux premières heures suivant le contact. Cependant pour des concentrations très élevée en *Vibrio* (R=10) les bactéries libres dans le plasma restent en nombre élevé dans le plasma ce qui suggère leur prolifération, une saturation des capacités d'adhésion aux hémocytes et/ou de phagocytose des hémocytes ainsi qu'un relargage possible des bactéries phagocytées par lyse de quelques hémocytes (effet cytophagène?). En ce qui

concerne les bactéries viables intra hémocytaires on observe une tendance identique bien que le phénomène de décroissance du nombre de bactéries viables soit plus étalé dans le temps, au moins 5 heures pour la disparition quasi totale des bactéries viables obtenus à des ratio de 1 ou 0,1. Ces résultats permettent de montrer que la phagocytose est une réaction de défense efficace tout au moins pour ces ratio hémocytes/vibrio. Lorsque $R=10$ et que les *Vibrio* sont ajoutés en grand nombre, les hémocytes perdent cette efficacité de phagocytose du fait probablement de l'existence d'un phénomène de saturation et/ou d'un effet cytopathogène des *Vibrio* déjà évoqué plus haut.

Il serait intéressant à l'avenir d'étudier le comportement différentiel de souches bactériennes (souche avirulente LM20012 versus souche virulente LGP32) ou de souches mutées sur des gènes candidats à la virulence (LGP32 sauvage versus LGP32 mutée) vis à vis du phénomène de phagocytose afin de mieux comprendre les interactions hémocytes/*Vibrio* et notamment les mécanismes de virulence des *Vibrios* et/ou de défense des hémocytes. Cependant le temps nous a manqué dans le cadre de ce stage pour réaliser ces tests comparatifs.

6. Bibliographie

AZEVEDO, C.; PADOVAN, I.; CORRAL, L.; PADOVAN, P. **Ultrastructural description of an unidentified apicomplexan oocyst containing bacteria-like hyperparasites in the gill of *Crassostrea rizophorae*. Diseases of Aquatic Organisms, 65 (2005), 153 – 157.**

BAUMANN, P; SCHUBERT, R. H. W.; **Family II Vibrionaceae Veron 1965, 5245^{AL}.**
Em: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (editores). *Bergey's manual systematic of bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, (1984), 516 – 517.

COMPS, M.; DUTHOIT, J. L. **Infection virale associée à la maladie des branchies de l'huître portugaise *Crassostrea angulata*. Lmk. C. R. Hebd. Séanc. Acad. Sc., 283 (1976), 1595 – 1596.**

FAURY, N.; SAULNIER, D; THOMPSON, F. L.; GAY, M.; SWINGS, J.; LE ROUX, F. ***Vibrio crassostreae* sp. nov., isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54 (2004), 2137 – 2140.**

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*. Diseases of Aquatic Organisms, 59 (2004), 49 – 56.**

GAY, M.; RENAULT, T.; PONS, A.M.; LE ROUX, F. **Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. Diseases of Aquatic Organisms, 62 (2004), 65 – 74.**

GRIZEL, H.; COMPS, M.; COUSSERANS F.; BONAMI J. R.; VAGO, C. **Étude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate. C. R. Acad. Sci., 279 (1974), 783 – 784.**

LACOSTE, A.; JALABERT, F.; MALHAM, S.; CUEFF, A.; GÉLÉBART, F.; CORDEVANT, C.; LANGE, M.; POULET, S. A. **A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France).** Diseases of Aquatic Organisms, 46 (2001), 139 – 145.

LE ROUX, F.; GAY, M.; LAMBERT, C.; NICOLAS, J.L.; GOUY, M.; BERTHE, F. **Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences.** Diseases of Aquatic Organisms, 58 (2004), 143 – 150.

LE ROUX, F.; GAY, M.; LAMBERT, C.; WAECHTER, M.; POUBALANNE, S.; CHOLLET, B.; NICOLAS, J.L.; BERTHE, F. **Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events.** Aquatic Living Resources, 15 (2002), 251 – 258.

PICHOT Y.; COMPS, M.; TIGE, G.; GRIZEL, H.; RABOUIN, M. A. **Recherche sur *Bonamia ostreae* gen. N., parasite nouveau de l'huître plate, *Ostrea edulis*. L.** Ver. Trav. Inst. Pêches Marit., 43 (1980), 131 – 140.

SABRY, R. C.; MAGALHÃES, A. R. M. **Parasitas em ostras de cultivo (*Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea gigas*) da Ponta do Sambaqui, Florianópolis, SC.** Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec., 57 (2005), 194 – 203.

SUGUMAR, G.; NAKAI, T.; HIRATA, Y.; MATSUBARA, D.; MUROGA, K. ***Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae.** Diseases of Aquatic Organisms, 33 (1998), 111 – 118.

THOMPSON, J.R.; PACOCHA, S.; PHARINO, C.; KLEPAC-CERAJ, V.; HUNT, D.E.; BENOIT, J.; SARMA-RUPAVTARM, R.; DISTEL, D.L.; POLZ, M.F. **Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population.** *Science*, 25, vol. 307 (2005), 1311 – 1313.

THOMPSON, J. R.; RANDA, M.A.; MARCELINO, L. A.; TOMITA-MITCHELL, Aoy; LIM, E.; POLZ, M.F. **Diversity and Dynamics of a North Atlantic Coastal *Vibrio* Community.** *Applied and Environmental Microbiology*, July 2004, 4103 – 4110.

VOLETY, A. K.; OLIVER, L. M.; GENTHNER, Fred J.; FISHER, W.S. **A rapid tetrazolium dye reduction assay to assess the bactericidal activity of oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes against *Vibrio parahaemolyticus*.** *Aquaculture* 172 (1999) 205 – 222.

WAECHTER, M.; LE ROUX, F.; NICOLAS, J.L.; MARISSAL, E.; BERTHE, F. **Caractérisation de bactéries pathogènes de naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas*.** *C.R. Biologies*, 325, (2002) 231 – 238.

7. Annexes

8.1) Composition de Milieux de Culture

8.1.1) Zobell Liquide:

- 1g extract de levedure;
- 4g tryptone;
- 1L EMA.

8.1.2) Zobell Solide:

- 15g agar granulé;
- 1g extract de levedure;
- 4g tryptone;
- 1L EMA.

8.1.3) EMA:

- 234g NaCl;
- 15g KCl;
- 12g MgSO₄, 7H₂O;
- 2g CaCl₂, 2H₂O;
- 1L eau destillée;
- 10% de dilution avec eau destillée (salinité 2,6‰)

8.2) Organisation de Micro-plaques

8.2.1) Test de Sensibilité Bactérienne avec MTS/PMS

	T1 = 1h		T2 = 2h		T3 = 3h		T4 = 4h		T5 = 5h		T6 = 6h	
5×10^8												
5×10^7												
5×10^6												
5×10^5												
5×10^4												
5×10^3												
5×10^2												
Zobell												

8.2.2) Echantillons Pour la Comptage sur Boîtes

	T1 = 1h		T2 = 2h		T3 = 3h		T4 = 4h		T5 = 5h		T6 = 6h	
LGP10 ³												
LGP10 ²												
LGP10 ¹												
Vide												
Vide												
LMG10 ³												
LMG10 ²												
LMG10 ¹												

8.2.3) Concentration de cloramphenicol

	10 ⁶ CFU/mL		10 ⁵ CFU/mL		10 ⁴ CFU/mL		10 ³ CFU/mL		10 ² CFU/mL		10 ¹ CFU/mL	
8 µg/mL												
4µg/mL												
2µg/mL												
1µg/mL												
0,5µg/mL												
0,25µg/mL												
0,125µg/mL												
0,06µg/mL												

8.2.4) Maintenance bactérienne pour le test des hémocytes et plasma

	2 x 10 ⁶		2 x 10 ⁵		2 x 10 ⁴		2 x 10 ³		2 x 10 ²		Zobell	
T1												
T2												
T3												
Vide												

8.2.5) Evaluation du Plasma

	2 x 10 ⁶		2 x 10 ⁵		2 x 10 ⁴		2 x 10 ³		2 x 10 ²		Zobell	
T1												
T2												
T3												
Vide												

RÉSUMÉ

L'élevage de mollusques d'intérêt aquacole et d'huître creuse *Crassostreae gigas* en particulier est confronté à des agent pathogènes qui ont une incidence économique non négligeable. Parmi eux des bactéries du genre *Vibrio*, l'un des genres bactériens les plus abondants dans les écosystèmes marins, sont retrouvées associées à des épisodes de mortalité. Ainsi plusieurs souches apparentées à *V. splendidus*, une espèce dominante de *Vibrio*, ont été dans quelques cas associées aux épisodes de mortalité estivale d'huître creuse sévissant en France depuis une quinzaine d'année. L'objet de cette étude a porté dans un premier temps sur le développement d'un test de quantification colorimétrique permettant de quantifier la densité bactérienne présente dans un échantillon. Ce test est basé sur l'utilisation de deux réactifs le MTS [3-(4,5-dymhetylyazol-2-yl)-5-(3-carboximhetoxyphenyl)-2-(4-sulfophenil)-2H-tetrazolium] et le PMS (phenazine metasulphate) comme indicateurs de la prolifération bactérienne. Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressés aux interactions *in vitro* entre vibrions et hémocytes qui constituent les cellules effectrices de l'immunité chez les invertébrés. La cinétique d'évolution d'une souche pathogène (TR32) ajoutée à de l'hémolymphe a été étudiée en cherchant à quantifier les bactéries présentes dans le plasma (libres) et celles associées aux hémocytes lors de la phagocytose .