

Suivi de l'accumulation et de la dépuraction de *Vibrio parahaemolyticus* chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* par cytométrie en flux

Marion Sorée¹, François Delavat², Christophe Lambert³, Mathias Papin⁴, Bruno Petton³, Lionel Degremont⁵, Virginie Le Razavet⁴, Delphine Passerini⁶, Christophe Stavrakakis⁴, Dominique Hervio-Heath³

¹ Ifremer, Centre Bretagne, Laboratoire LSEM, Plouzané, France

² Université de Nantes, CNRS, UMR 6286 UFIP, Nantes, France

³ Université de Brest, CNRS, IRD, Ifremer, UMR 6539 LEMAR, Plouzané, France

⁴ Ifremer, Plateforme Mollusques Marins de Bouin, Bouin, France

⁵ Ifremer, Centre Atlantique, Laboratoire LGPMM, La Tremblade, France

⁶ Ifremer, Centre Atlantique, Laboratoire LEM3B, Nantes, France

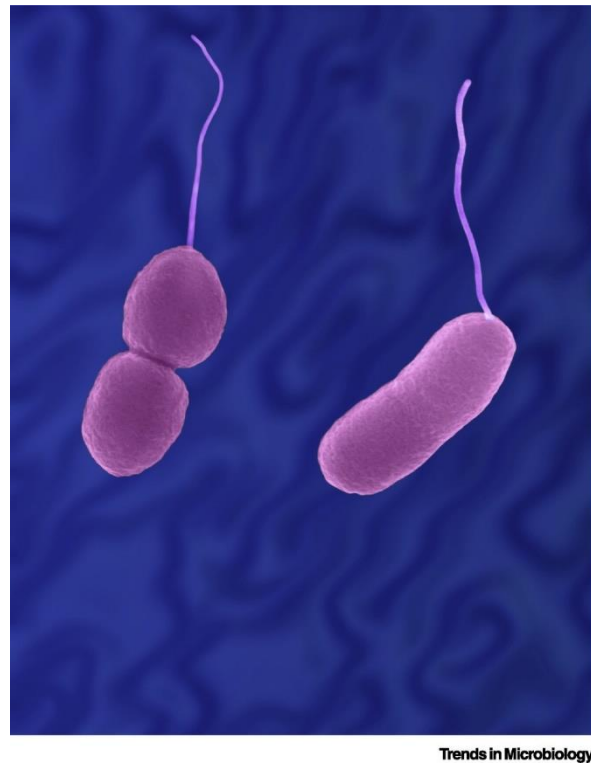


Vibrio parahaemolyticus

V. parahaemolyticus (Vp) est une bactérie marine dont la prolifération suit la saisonnalité avec un pic d'abondance entre mai et octobre pour l'hémisphère nord (température de l'eau >15°C) [1].

C'est le 1^{er} agent causal bactérien de gastroentérites liées à la consommation de fruits de mer crus ou insuffisamment cuits au monde. Entre 1973 et 2006, Vp a été responsable de 35% des toxi-infections aux Etats-Unis [2].

Les facteurs de virulence identifiés permettant de caractériser la pathogénicité des souches sont les hémolysines TDH (Thermostable-Direct Hemolysin) et TRH (TDH-Related Hemolysin) ainsi que le système de sécrétion de type III [1].



Huître creuse *Crassostrea gigas*

La France est le 6^e pays producteur d'huîtres creuses dans le monde représentant plus de 90% de la production européenne. En 2019, l'ostréiculture a généré plus de 1,2 millions US\$ dans le monde [3].

Du fait de leur capacité de filtration de l'eau, cela fait de ces huîtres des sentinelles de l'environnement. En effet, du fait de cette filtration, elles accumulent les contaminants présents dans l'eau, ce qui fait également d'elles un potentiel risque pour la santé humaine.

Il a été montré que *V. parahaemolyticus* est isolé préférentiellement chez l'huître creuse (63,4%) et un peu moins chez d'autres produits de la mer (e.g. palourdes 52,9%) [4].



Le but de cette étude est d'étudier l'accumulation et la dépuraction de différentes souches de *Vibrio parahaemolyticus* chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Pour cela :

- Développement de souches de *V. parahaemolyticus* GFP⁺ (Vp-gfp⁺)
- Déterminer si la cytométrie en flux est une bonne alternative au dénombrement sur boîtes
- Comparer l'accumulation et la dépuraction de souches Vp-gfp⁺ chez différents lots d'huîtres creuses

Electroporation de *V. parahaemolyticus*

Objectif : Développer des souches Vp-gfp⁺ afin de les différencier de souches Vp naturellement présentes chez des huîtres provenant de l'environnement.

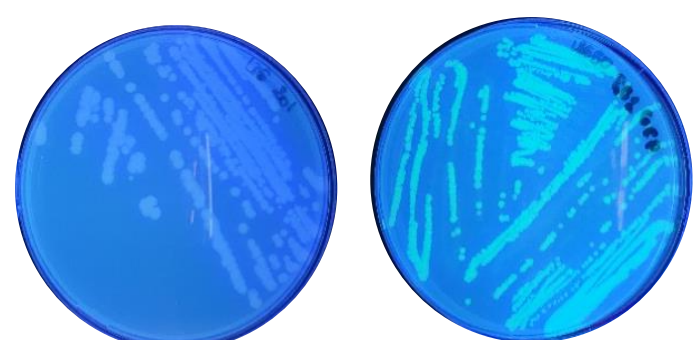


Figure 1. La souche IFVp201 (gauche) et IFVp201-gfp⁺ (droite) sous lumière UV

L'électroporation permet l'obtention de souches GFP en 2-3 jours en comparaison à 1-2 semaine(s) pour la conjugaison (Figure 1)

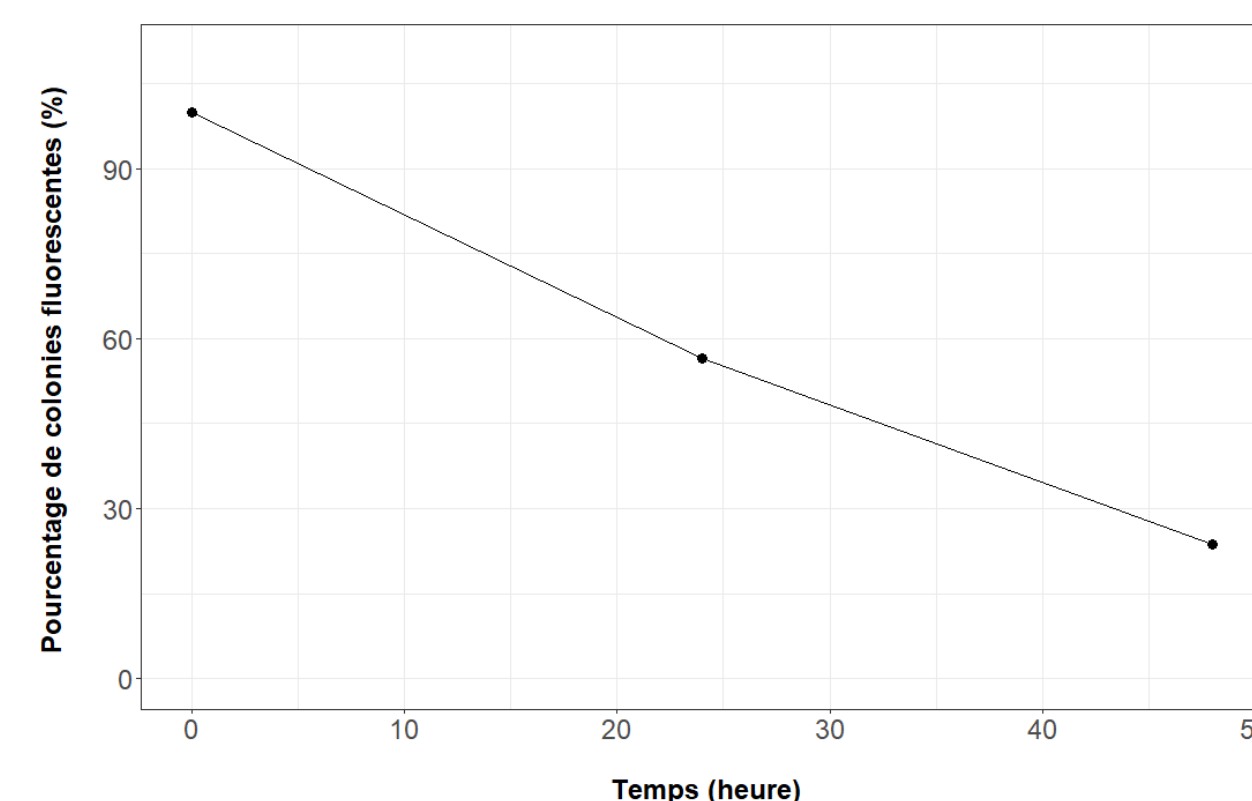


Figure 2. Pourcentage de présence du plasmide chez les colonies IFVp201-gfp⁺ dans du Luria-Bertani 1,5% NaCl (LBS)

Test de la stabilité du plasmide sur 48h (4 repiquages) en milieu LBS : persistance dans 23% des colonies après 48h de repiquages (Figure 2)

Test de la stabilité du plasmide sur 48h en conditions expérimentales (sans repiquage, eau de mer stérile) : persiste dans 100% des colonies (données non montrées)

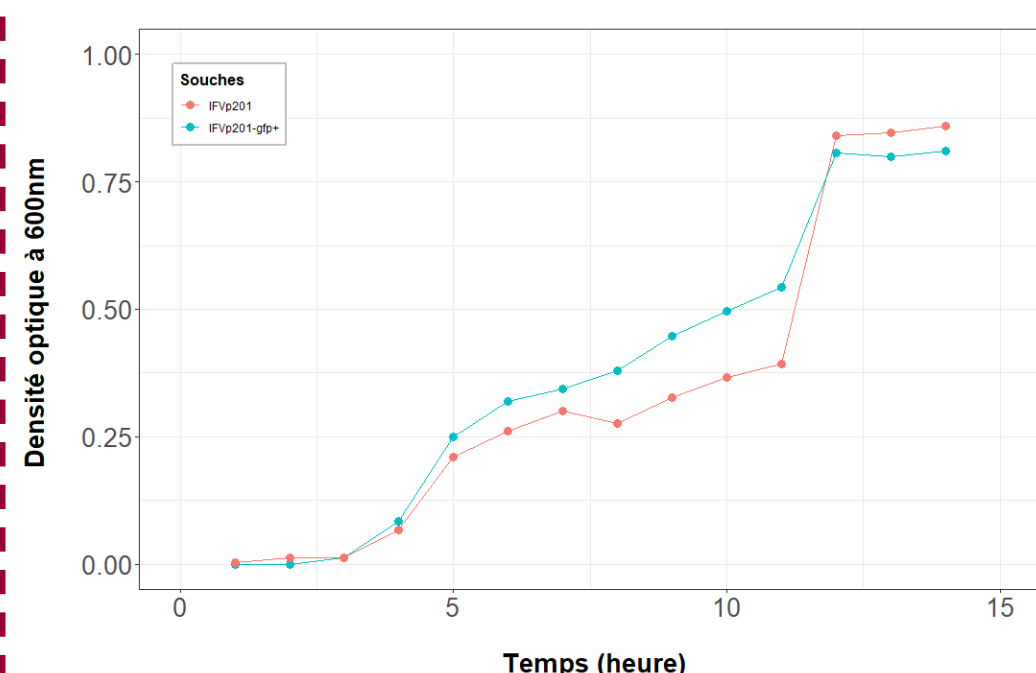


Figure 3. Courbes de croissance de IFVp201-gfp⁺ et IFVp201 en LBS

Pas de différence de croissance entre la souche GFP⁺ et la souche sauvage (Figure 3)

Cytométrie en flux sur des échantillons d'huîtres creuses

Objectifs : Déterminer si la cytométrie en flux (CFL) serait une bonne alternative au dénombrement sur boîtes (DSB) des souches Vp-gfp⁺. Déterminer quelle matrice de l'huître serait la plus pertinente pour des mesures en cytométrie en flux.

J1 : Baignade d'huîtres avec la souche IFVp201-gfp⁺ → J2 : Ponction hémolymphe et broyage des tissus → J2 : Analyses en cytométrie en flux et dénombrement sur boîtes

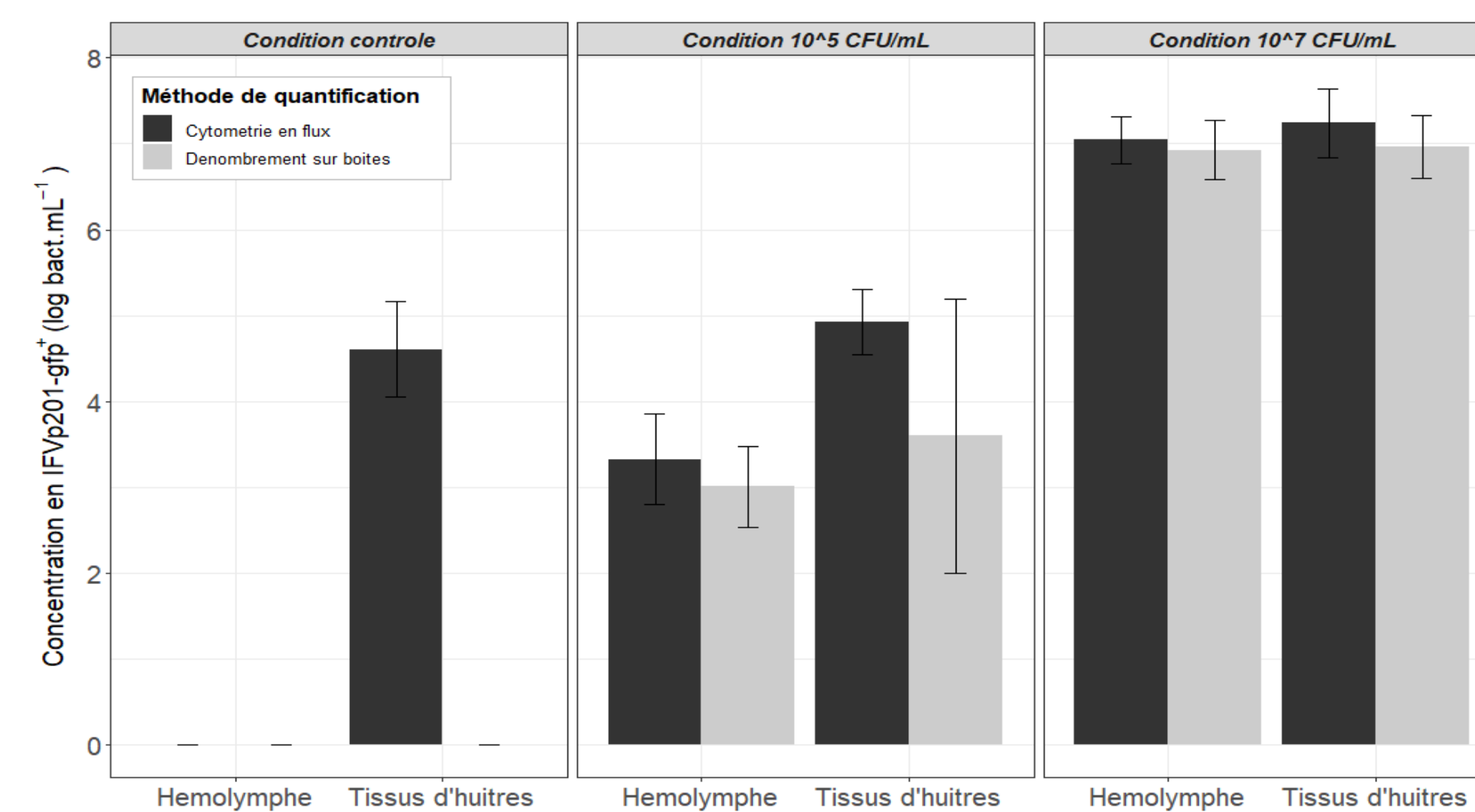


Figure 4. Concentration d'IFVp201-gfp⁺ (log bactérie/mL) dans l'hémolymphe ou les tissus d'huîtres creuses exposées ou non à 10⁵ ou 10⁷ CFU/mL pendant 16h. Quantifications par cytométrie en flux (CFL) ou dénombrement sur boîtes (DSB). n = 3

Pas de détection dans l'hémolymphe (CFL et DSB). Détection de 4,5 log (event/mL) dans les tissus par CFL alors qu'il n'y a pas de détection par DSB

Détection entre 3,5 et 4,5 log (bactérie/mL) dans les tissus par DSB et CFL, respectivement et d'environ 3 log dans l'hémolymphe (CFL et DSB)

Détection d'environ 7 log (bactérie/mL) dans les tissus et l'hémolymphe par CFL et DSB.

Choix de 10⁵ CFU/mL pour mieux refléter la réalité

Cytométrie en flux est une bonne alternative au dénombrement sur boîtes

Choix de l'hémolymphe vis-à-vis des tissus

Expérimentations *in vivo* chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*

Objectif : Etudier l'accumulation et la dépuraction de différentes souches de Vp-gfp⁺ chez deux lots d'huîtres différents.

Souches	tdh	trh
Vp201-gfp ⁺	+	+
Vp69-gfp ⁺	-	-
Vp195-gfp ⁺	+	-
LMG2850-gfp ⁺	-	+

➢ Huîtres juvéniles standardisées, élevées en conditions contrôlées depuis le stade larvaire

➢ Huîtres adultes sauvages récoltées sur les côtes atlantiques françaises et maintenues sur estran

J1 : Baignade d'huîtres avec les souches de Vp-gfp⁺ (10⁵ UFC/mL)

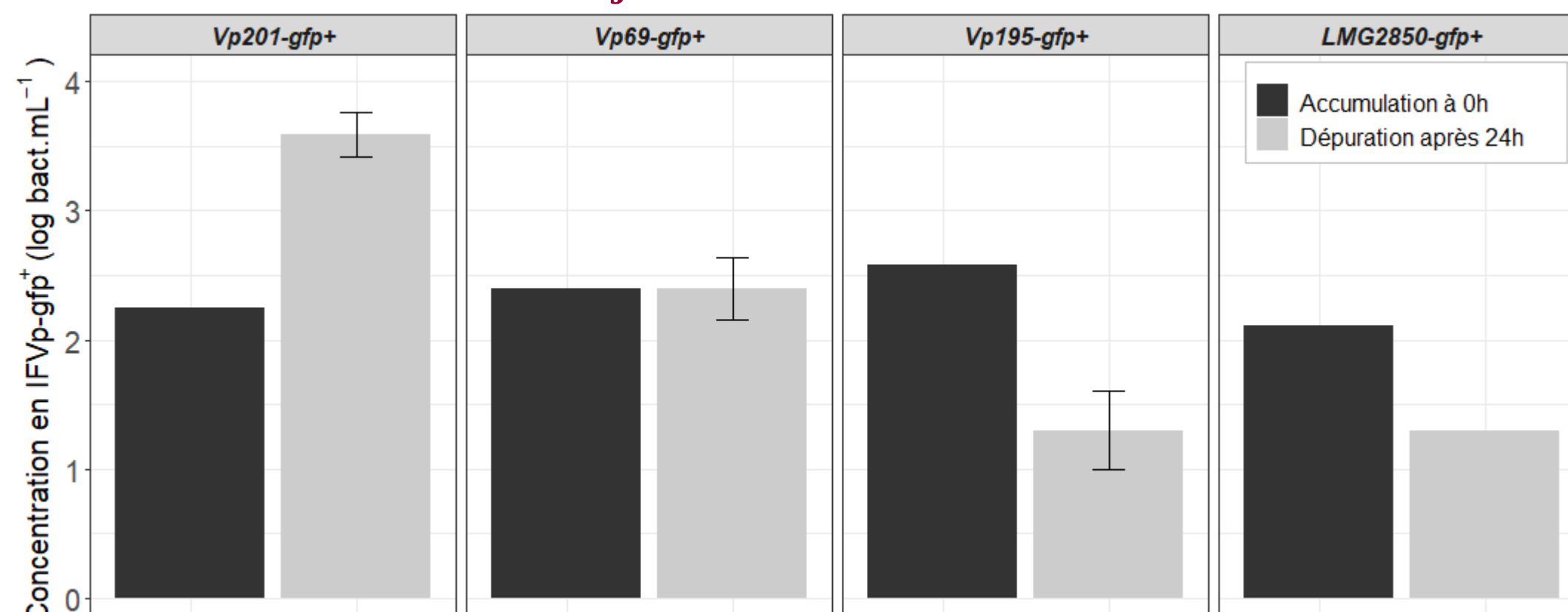
J2 : Lavage dans de l'eau de mer nouvelle (~1h)

J3 : Dépuraction des huîtres pendant 24h

Cytométrie (Accumulation à t0)

Cytométrie (Dépuraction à 24h)

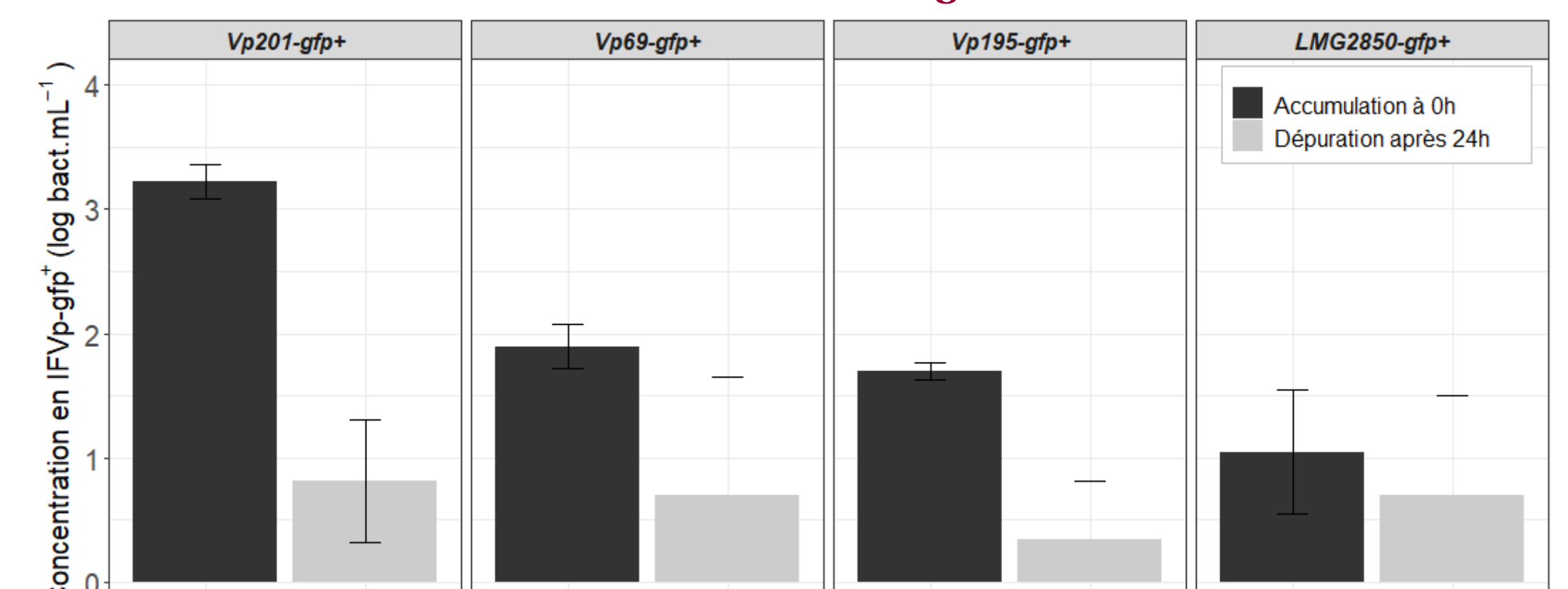
Huîtres juvéniles standardisées



Accumulations similaires peu importe la souche
Dépurations variables en fonction des souches

Figure 5. Concentration en IFVp-gfp⁺ (log bactérie/mL) dans l'hémolymphe d'huîtres standardisées exposées à 10⁵ CFU/mL pendant 16h (Accumulation à 0h) puis après 24h dans de l'eau de mer nouvelle (Dépuraction après 24h)

Huîtres sauvages



Accumulations variables en fonction des souches
Dépurations similaires peu importe la souche

Figure 6. Concentration en IFVp-gfp⁺ (log bactérie/mL) dans l'hémolymphe d'huîtres sauvages exposées à 10⁵ CFU/mL pendant 16h (Accumulation à 0h) puis après 24h dans de l'eau de mer nouvelle (Dépuraction après 24h)

L'âge et/ou les conditions d'élevages des huîtres semblent impacter les capacités d'accumulation et de dépuraction des huîtres

Les profils de facteurs de virulence semblent impacter les phénomènes d'accumulation et de dépuraction chez les huîtres

Conclusions

- Production de souches de *Vibrio parahaemolyticus* GFP⁺ par électroporation
- Développement de la cytométrie en flux pour le dénombrement de bactéries dans l'hémolymphe d'huîtres
- Accumulation et dépuraction dépendent i/ du type et de l'âge de l'huître ii/ du profil génétique de la souche de *V. parahaemolyticus*

Perspectives

- Répéter des expérimentations avec des huîtres ayant le même âge : répondre à l'hypothèse que des huîtres élevées dans des conditions différentes impactent l'accumulation et la dépuraction
- Utilisation des méthodes développées pour d'autres expérimentations : étude de l'impact du niveau de ploïdie sur l'accumulation et la dépuraction de *V. parahaemolyticus*

[1] Hervio-Heath D., Garry P. *Vibrio*, espèces pathogènes. Microorganismes pathogènes et aliments. ED. Lavoisier. STAA. 547-559 (2017).

[3] Food and Agriculture Organization (FAO) – Fishery Statistical Production, Global Aquaculture Production – FIGIS

[5] Morot, A. et al. Virulence of *Vibrio harveyi* ORMA towards the European abalone *Haliotis tuberculata* involves both quorum sensing and a type III secretion system. *Environ. Microbiol.* (2021)

[2] Iwamoto, M. et al. Epidemiology of seafood-associated infections in the United States. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 399-411 (2010).

[4] Odeyemi, O. A. Incidence and prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: a systematic review and meta-analysis. *Springerplus* 5, (2016).