

La phage-thérapie peut elle constituée une alternative aux antibiotiques dans les élevages d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* ?

Projet de Master 2 proposé par Frédérique Le Roux, Directrice de recherche Ifremer, HDR ; Responsable de l'équipe génomique des vibrios, UMR CNRS-UPMC 8227, Biologie intégrative des modèles marins, Station Biologique de Roscoff.

Articles récents de l'équipe

- Ancestral gene acquisition as the key to virulence potential in environmental *Vibrio* populations. Bruto M, Labreuche Y, James A, Piel D, Chenivresse S, Petton B, Polz MF, Le Roux F. **ISME J**. 2018 Aug 2. doi: 10.1038/s41396-018-0245-3.
- Nigritoxin is a bacterial toxin for crustaceans and insects. Labreuche Y, Chenivresse S, Jeudy A, Le Panse S, Boulo V, Ansquer D, Pagès S, Givaudan A, Czjzek M, Le Roux F. **Nat Commun**. 2017 Nov 1;8(1):1248.
- *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. Bruto M, James A, Petton B, Labreuche Y, Chenivresse S, Alunno-Bruscia M, Polz MF, Le Roux F. **ISME J**. 2017 Apr;11(4):1043-1052.
- Oysters and Vibrios as a Model for Disease Dynamics in Wild Animals. Le Roux F, Wegner KM, Polz MF. **Trends Microbiol**. 2016 Jul;24(7):568-580. Review.

Contexte

La production d'huîtres en France illustre la fragilité d'une aquaculture intensive dans un contexte où il est urgent de développer un apport nutritionnel en protéines animales de manière équitable et sécurisé pour l'homme et l'environnement. Face à une succession de maladies affectant l'huître, la compensation des pertes par l'augmentation du nombre de juvéniles placées sur sites ostréicoles et la production en éclosion d'animaux plus résistants, constituent les principales stratégies visant au développement de ce secteur économique. Aujourd'hui, 50% des huîtres juvéniles élevées en milieu naturel proviennent d'éclosion. Dans ces éclosions, l'utilisation d'antibiotiques continue d'être pratiquée courante lors de l'induction de la gamétogénèse (maturation) chez les géniteurs et dans le cas d'apparition de mortalités au cours de l'élevage larvaire.

De récents résultats nous questionnent quant aux risques de telles stratégies. Nous avons montré que certaines bactéries du genre *Vibrio*, présentes naturellement dans les environnements côtiers, (clades Splendidus, Harveyi et Anguillarum), représentent un risque d'infections opportunistes pour les huîtres. De plus, l'huître constitue une niche dans laquelle le transfert de plasmides et la sélection de vibrios portant ces plasmides sont amplifiés. Il s'agit par exemple d'un plasmide démontré responsable de la transition pathogénique chez *V. crassostreae* et *V. splendidus*, vibrios potentiellement pathogènes d'huîtres et de moules. Nous avons de plus observé qu'un plasmide, identifié chez des vibrios isolés d'éclosion de mollusques en Espagne et codant une résistance à trois antibiotiques, se transfère beaucoup plus efficacement dans l'huître et ce, même en absence d'utilisation d'antibiotique. **Ce projet s'inscrit dans une volonté de développement d'une ostréiculture Eco-responsable.** Nous désirons explorer l'impact de l'utilisation d'antibiotiques en éclosion sur l'émergence de vibrios multi-résistants. Plus généralement nous comparerons les profils de résistance de vibrios isolés de milieux fortement ou faiblement anthropisés. Nous désirons évaluer la faisabilité d'une alternative de type phage-thérapie en étudiant la dynamique des vibrios pathogènes et de leurs prédateurs, les phages, lors d'événements de mortalité d'huîtres en éclosion. Un verrou majeur à résoudre est la diversité des vibrios pathogènes présents dans les géniteurs introduits en éclosion face à la grande spécificité des phages.

Ce projet pourra être poursuivi dans le cadre d'un doctorat qui visera à comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine des transferts horizontaux dans l'huître et/ou les mécanismes d'interaction phages-vibrios en lien avec l'écologie des vibrios pathogènes d'huîtres.

Approche expérimentale

En janvier 2019, des huîtres adultes (nommées par la suite « donneuses ») seront prélevées en zones ostréicoles ou non ostréicoles et conditionnées au laboratoire pour induction de la maturation sexuelle. Il s'agit sur une période de 15 jours, d'augmenter progressivement la température en apportant une forte quantité de phytoplancton. Cette maturation se fera en présence ou en absence d'antibiotique. Chaque donneuse sera placée en cohabitation avec une dizaine d'huîtres juvéniles (nommées « receveuses ») pour évaluer la transmission d'agent(s) infectieux induisant des mortalités. Les vibrios présents dans l'eau seront quantifiés quotidiennement sur milieu sélectif (TCBS). Un filtrat d'eau $>0.2\mu\text{m}$ sera aussi conservé en glycérol à -80°C pour archivage de bactéries cultivables ou ADN total.

En présence d'antibiotique, avant, pendant la période de maturation et jusqu'à l'étape de fécondation, une fois par semaine, 2 à 3 huîtres juvéniles seront sacrifiées et les tissus broyés conservés en glycérol à -80°C . Les bactéries présentes dans les stocks glycérol d'eau où d'huîtres seront sélectionnées sur une gélose contenant l'antibiotique utilisé en élevage. Par la suite leur profil de résistance aux principales classes d'antibiotiques sera déterminé, ainsi que celui d'une collection de vibrios isolés de zone d'activité anthropogénique forte (Brest, France) ou faible (Sylt, Allemagne). Dans le cas de la mise en évidence de profils de multiple résistance, nous rechercherons la présence d'élément(s) génétique(s) mobile(s) par i) extraction d'ADN plasmidique; ii) transfert d'élément génétique mobile *in vitro* ou *in vivo*.

Par ce protocole expérimental nous espérons i) mettre en évidence l'émergence de vibrios résistants aux cours du procédé de maturation d'huître en présence d'antibiotiques ; ii) confirmer le rôle de l'huître comme niche de transfert d'élément génétique mobile porteur de multiple résistance ; iii) explorer un contraste du profil de résistance des vibrios entre zones fortement ou faiblement anthropogéniques.

Dans le cas d'apparition de mortalités, en absence d'antibiotique, le virus herpes de l'huître, OsHV, sera recherché dans les huîtres juvénile moribondes afin d'éliminer de notre échantillonnage les événements potentiellement liés à ce virus. Dès l'observation des premières mortalités et pendant une période de 8 à 15 jours (selon la dynamique des mortalités), un concentré de phages (1000X) sera préparé chaque jour par la méthode de floculation au Fer d'eau filtrée à $<0.2\mu\text{m}$ et conservé à 4°C . Un broyat d'huîtres moribondes sera aussi filtré à $<0.2\mu\text{m}$ et conservé à 4°C . Les vibrios potentiellement pathogènes d'huîtres (*Splendidus*, *Anguillarum* et *Harveyi*) seront identifiées par PCR (sondes R5.7, crass, MARTX, Vam, pGV1512), ré-isolés et conservés à -80°C . La virulence de ces souches sera confirmée par infection expérimentale d'huîtres juvéniles. Les vibrios pathogènes seront alors utilisés comme proie dans des essais d'infection avec les floculats de phages ou les broyats d'huîtres filtrés.

Par ce protocole expérimental nous espérons i) mettre en évidence un rôle des huîtres comme réservoir de vibrios pathogènes; ii) identifier ces vibrios pathogènes ; iii) en isolant chaque huître « réservoir », établir une collection proies (vibrios) moins génétiquement diversifiée afin de iii) suivre la dynamique de leur prédateurs (phage) dans l'eau et l'huître.