



HAL
open science

Approches microbiologiques et moléculaires pour lutter contre la vibriose du bar (*Dicentrarchus labrax*)

Julia Mougin

► **To cite this version:**

Julia Mougin. Approches microbiologiques et moléculaires pour lutter contre la vibriose du bar (*Dicentrarchus labrax*). Sciences du Vivant [q-bio]. Université du Littoral Côte d'Opale - ULCO, 2020. Français. NNT: . tel-04557395

HAL Id: tel-04557395

<https://ulco.hal.science/tel-04557395>

Submitted on 24 Apr 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

Université du Littoral Côte d'Opale

Ecole Doctorale des Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

Thèse de doctorat

Pour obtenir le grade de

Docteur

Discipline : Biologie, Médecine, Santé

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par

Julia MOUGIN

Approches microbiologiques et moléculaires pour lutter contre la vibriose du bar (*Dicentrarchus labrax*)

Soutenue le 11 Décembre 2020

Devant le jury composé de :

Dr. Christine PAILLARD	Directrice de Recherche, CNRS, Brest	Rapporteur
Dr. Alexis BAZIRE	Maître de Conférences, Université de Bretagne Sud	Rapporteur
Dr. Dominique HERVIO-HEATH	Cadre de Recherche, IFREMER, Brest	Examinatrice
Dr. Jean-Michel BOLLA	Directeur de Recherche, INSERM, Marseille	Examinateur
Pr. Sébastien MONCHY	Professeur des universités, Université du Littoral Côte d'Opale	Président du jury
Dr. Cédric LE BRIS	Maître de Conférences, Université du Littoral Côte d'Opale	Encadrant
Pr. Thierry GRARD	Professeur des universités, Université du Littoral Côte d'Opale	Directeur de thèse

Remerciements

J'ai quitté la Catalogne, il y a de cela bien longtemps. À l'aube où je pensais y retourner, je me suis finalement engagée pour 3 belles années à vos côtés. J'ai fui la chaleur de mon Sud pour la grisaille du Nord. Pourtant, cette chaleur, je l'ai retrouvée auprès des personnes que j'ai côtoyées. Ce préambule est dédié à toutes les personnes que j'ai croisées au cours de cette odyssee.



J'adresse tout d'abord ma gratitude aux financeurs de cette thèse, la région Hauts-de-France et l'ULCO. Ces travaux ont également été financés par le gouvernement français, l'IFREMER et la région Hauts-de-France, faisant partie intégrante du projet CPER MARCO 2014-2020. Enfin cette thèse a aussi été financièrement épaulée par le biais d'un projet FEAMP (PFEA470017FA1000006), dénommé LUVIBAR. Je tiens à remercier particulièrement Dr. Christine PAILLARD et Dr. Alexis BAZIRE d'être rapporteurs de ces travaux. Je remercie également les membres du jury, Dr. Dominique HERVIO-HEATH, Dr. Jean-Michel BOLLA et Pr. Sébastien MONCHY pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.



Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'unité Biochimie des Produits Aquatiques (BPA), composante de l'UMR transfrontalière BioEcoAgro intégrant l'institut Charles VIOLLETTE et conventionnée à l'Anses *via* une unité sous contrat avec le Laboratoire de Sécurité des Aliments (LSA) localisé à Boulogne sur mer. J'ai également eu la chance de travailler à Gravelines au sein de la ferme Aquanord-Ichthus, ainsi qu'à l'Université de Lille sur la plate-forme REALCAT.

Je tiens à adresser mes remerciements :

À Maryse BONNIN-JUSSERAND, sans qui tout cela n'aurait pas pu commencer. Je te remercie de m'avoir accordée ta confiance dès mon stage de fin d'études Ingénieur, ainsi que d'avoir partagé tes connaissances avec moi. Je tiens également à t'adresser un grand merci pour tes nombreux encouragements.

À Cédric LE BRIS, pour ta disponibilité, ton écoute ainsi que ton exigence. Ce fut un réel plaisir de travailler à tes côtés. Nos discussions, aussi bien au laboratoire qu'autour d'une bière, ont toujours été fort appréciées. Grâce à toi, j'ai le sentiment d'avoir mené ces travaux avec beaucoup d'autonomie tout en étant solidement épaulée, surtout lors de mes périodes de doutes. J'ajouterais que selon moi, ce sont les personnes les plus exigeantes qui nous font le plus progresser et mûrir, alors je te remercie sincèrement de l'avoir été avec moi.

À Thierry GRARD, pour ton soutien, ta bonne humeur ainsi que ta franchise. Je te remercie d'avoir partagé avec moi les arcanes du métier de chercheur, parsemées d'anecdotes cinématographiques et

musicales. Je tiens à t'adresser un grand merci pour les opportunités que j'ai eu la chance d'avoir, en particulier pour ma participation à 2 conférences internationales, aux Îles Féroé et au Canada.

Enfin, merci à vous 3 pour la qualité de l'encadrement que j'ai pu recevoir au cours de ces 3 années. J'ai beaucoup appris à vos côtés, autant sur le plan professionnel que personnel, et je vous en suis très reconnaissante.

À Roxane ROQUIGNY *alias Roro*, pour ta bonne humeur, ta patience ainsi que nos fous rires. Travailler avec toi fut fort agréable, les feux toujours au vert, Chante-France à fond, un cookie à portée de main et un bon de colère à froisser violemment et à jeter rageusement dans un coin, en cas de crise. Plus sérieusement, merci pour tous les moments que nous avons partagés.

À Christophe FLAHAUT, pour ta disponibilité, ta patience ainsi que ton soutien sur Lille. Je te remercie particulièrement pour tout le temps que tu m'as accordé et pour avoir partagé tes connaissances et tes compétences avec moi.

À tout le personnel d'Aquanord-Ichtus. Je souhaite en particulier remercier Annabelle DUHAMEL, Céline DOYEN, Guillaume TIELIE et Yann LEGUIL pour votre disponibilité, votre soutien et votre bienveillance. Un grand merci à tous les élèves qui ont pris le temps de m'aider et de converser avec moi lors de la campagne d'échantillonnage, ainsi qu'aux ouvriers qui ont fait preuve d'ingéniosité pour fabriquer les 300 morceaux de béton.

Aux membres de mon comité de suivi de thèse pour votre temps et vos précieux conseils, Graziella BOURDIN, Dominique HERVIO-HEATH, Jean-Michel BOLLA, Christophe FLAHAUT et Sami SOUSSI.

Je tiens à adresser toute ma gratitude aux personnes qui m'ont aidée pendant l'élaboration de ma thèse : Thomas BRAUGE pour ton soutien, ton écoute et ta bonne humeur, merci d'avoir toujours répondu présent à l'appel d'un jogging ou plus régulièrement à l'appel d'une bière ; Alexandre DEHAUT pour ton soutien et tes précieux conseils qui ont toujours été d'une grande richesse ; Stéphanie COPIN pour tes précieux conseils ; Egon HEUSON pour ton accueil chaleureux et ton aide sur REALCAT, ainsi que Roxane RAULO ; Mahammed ZIDOUR pour tes conseils concernant le MALDI-TOF MS ; Méline SORET pour ta disponibilité et pour m'avoir suppléée les semaines d'échantillonnage quand je n'étais pas disponible ; Périne DOYEN pour tes conseils ; Dennis WATIER pour tes talents de bricoleur, merci d'avoir confectionné les gabarits en acier inoxydable ; Philippe LENCEL pour ton appui lors des TP d'IUT ; Marie-France Louchet pour ta disponibilité et ton aide précieuse ; Guillaume DUFLOS pour m'avoir chaleureusement accueillie au sein du laboratoire ; Marie-Agnès TRAVERS pour tes précieux conseils ; Lucie COURCOT pour m'avoir accueillie au LOG à Wimereux et pour avoir partagé tes connaissances sur le MEB ; Cindy DUCROCQ pour tes conseils relatifs à la préparation des milieux ; et enfin *last but not least*, Marie-Ange HUCHIN pour m'avoir naturellement épaulée.

Aux stagiaires. Un grand merci à Juliette GAUDILLAT pour avoir mené à bien tes travaux, toujours dans la bonne humeur. Jonathan SABLIER, bien que la situation sanitaire fut compliquée, tu as su t'adapter et rebondir. Je remercie également Juliette FONTENILLE, pour ses travaux de stage à BioFilm Control.

Je tiens à adresser mes remerciements à tous les membres des équipes que j'ai côtoyés au cours de ces 3 années, aussi bien à l'ULCO qu'à l'Anses et que sur REALCAT, pour l'accueil que j'ai reçu ainsi que pour les conditions dans lesquelles j'ai pu travailler. Merci également aux équipes de LABOCEA, de BioFilm Control et du laboratoire MCT de la faculté de pharmacie de l'Université Aix-Marseille.

J'adresse une mention spéciale à Nina *alias face de poulpe* pour son brin de folie, à Charlotte *alias Cafard furieux/Grand sage Rafiki* et à Mathilde *alias la Terre des petits Crapauds* pour avoir mis des paillettes dans ma vie.

À mes confrères, les doctorants ; Ludovic et Arnaud, pour nos discussions, nos délires et nos embûches, j'espère avoir été un bon Padawan et que vous m'accorderez le rang de Maître ; Jérôme, pour ton humour décalé *#Poutinesurunours* ; Maureen, la petite *grumpy*, pour tes encouragements et nos dressages de goélands. Enfin, je souhaite bonne continuation aux nouveaux arrivants Fleurine, Tiffanie, Erwan et Sylvain.



Je tiens à adresser mes remerciements à toutes les rencontres aussi inopinées qu'enrichissantes. À mes *tiot biloutes*, Aurélie, Carole, Duduss, Fabouchet, Frankepic, La Dipe, Martin, Matthew, Ricou, Solène, ptit'B, et bien d'autres. Je n'ai malheureusement pas la possibilité de tous vous citer mais sachez que ces 3 années n'auraient pas été les mêmes sans vous. J'adresse un merci particulier à Alaïa *alias ma vieille morue*, pour nos sessions de surf et nos soirées stat/cookies ; à Maria pour nos sessions sportives et nos discussions toujours aussi enrichissantes ; à Kelly *alias Po*, Charles *alias La-La* et Baptiste *alias Dipsy* pour nos fous rires, notre entraide et nos sessions de travail entrecoupées de jeux de société au Kawa.

À mes amis de longue date et en particulier à mes *Knakies*, Charline, Claire, Justine, Laura, Maureen et Suzy, pour votre soutien inconditionnel depuis nos débuts en prépa au Lycée du Parc. Un merci particulier à Maureen, toujours à l'écoute et prête à faire des kilomètres, ainsi que Suzy, *alias mon Gandalf/Coquillage des Îles*, pour nos fous rires et nos escapades à Lille, Bruxelles et Amsterdam. Un grand merci également à mes amis en terre catalane, particulièrement à Eugénie *alias mon suricate des îles* et enfin à Alexandre.

À ma famille, et en particulier à mes parents. L'achèvement de ce travail est le fruit de votre soutien total. Je vous remercie pour m'avoir laissée faire mes propres choix comme je l'entendais et pour avoir relu ce manuscrit à la recherche de la moindre faute d'orthographe. Je crains un Bescherelle pour Noël.

À Sébastien.

Sommaire

Liste des abréviations.....	1
Liste des Tableaux	3
Liste des Figures	4
Introduction	7
Chapitre I. Contexte scientifique et économique	11
1. L'aquaculture du bar commun : <i>Dicentrarchus labrax</i>	13
1.1. Systématique et caractéristiques biologiques.....	13
1.2. Marché et réglementation	15
1.3. L'élevage du bar commun	17
1.4. Les challenges d'aujourd'hui	21
2. Les bactéries du genre <i>Vibrio</i>	24
2.1. Systématique et caractéristiques des <i>Vibrio</i>	24
2.2. La stratégie d'adaptation des <i>Vibrio</i>	30
2.3. Les interactions hôte – <i>Vibrio</i>	35
3. L'espèce <i>Vibrio harveyi</i>	38
3.1. Historique et taxonomie.....	38
3.2. Maladies associées à l'espèce <i>Vibrio harveyi</i>	39
3.3. Pathogénie et virulence.....	42
4. Méthodes de détection et d'identification de <i>Vibrio harveyi</i>	51
4.1. Méthodes culturales de croissance et identification phénotypique.....	52
4.2. Techniques de biologie moléculaire	54
4.3. Analyse protéomique par MALDI-TOF MS.....	60
5. Les moyens de lutte contre la vibriose en aquaculture	63
5.1. Principes de gestion des maladies en milieu aquacole.....	63
5.2. Les mesures de contrôle appliquées à ce jour	65
5.3. Les mesures de contrôle alternatives.....	69
Chapitre II. Développement d'une PCR en temps réel pour la détection et la	
quantification de <i>Vibrio harveyi</i> en milieu aquacole.....	75
1. Contexte	76
2. Mise au point de la PCR en temps réel.....	77
2.1. Conception des amorces.....	77

2.2.	Sélection des couples d'amorces	78
2.3.	Optimisation.....	80
3.	Adaptation au traitement d'échantillons environnementaux	82
3.1.	Echantillons d'eau	82
3.2.	Echantillons de biofilms.....	84
4.	Validation et application de la PCR en temps réel : Article 1.....	86
	Article 1.....	87
	Schéma de synthèse	115
Chapitre III. Développement de la Luvibase, une base de données permettant		
l'identification par MALDI-TOF MS des espèces du clade Harveyi..... 117		
1.	Contexte	118
2.	Utilisation de la base de données Bruker et de la VibrioBase.....	119
3.	Développement et validation de la Luvibase : Article 2	122
	Article 2.....	123
	Schéma de synthèse	146
Chapitre IV. Distribution spatiale et temporelle des Vibrionaceae et de l'espèce		
<i>Vibrio harveyi</i> dans un élevage aquacole de bars communs 147		
1.	Contexte	148
1.1.	Aquanord-Ichtus en quelques chiffres.....	148
1.2.	Le site d'élevage.....	148
1.3.	La problématique de la vibriose sur Aquanord-Ichtus.....	149
2.	Distribution spatiale et temporelle des <i>Vibrio</i> en milieu aquacole : Article 3	151
	Article 3.....	153
3.	Etude préliminaire des capacités d'adhésion et de formation de biofilms	180
3.1.	Tentative d'étude <i>in vitro</i> de formation de biofilms sur béton.....	180
3.2.	Quantification relative de la formation de biofilm par coloration au cristal violet	181
3.3.	Caractérisation du biofilm grâce au Biofilm Ring Test®	184
	Schéma de synthèse	190
Discussion et perspectives..... 191		
1.	Les outils et méthodes d'identification	192
1.1.	Les méthodes moléculaires.....	193
1.2.	Le MALDI-TOF MS.....	195
1.3.	Comparaison synthétique des différentes méthodes utilisées	198

2. Etude de la dynamique des <i>Vibrio</i> potentiellement pathogènes.....	199
3. Perspectives	202
3.1. Caractérisation des différentes souches	203
3.2. Etude de la capacité de formation de biofilms	206
4. Schéma de synthèse.....	210
Valorisation des travaux de thèse.....	211
Références.....	215
Annexes	253

Liste des abréviations

AB	Agriculture Biologique
Abi	Avortement de l'infection
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFLP	Amplified Fragment-Length Polymorphism
AgNP	Nanoparticule d'argent
AI	Auto-Inducteur
ANR	Agence Nationale de la Recherche
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	ARN ribosomique
BCCM	Belgian Coordinated Collections of Microorganisms
BFI	Indice de Formation du Biofilm
BFIc	BFI cut-off
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLIS	Bacteriocin-Like Substance
BP	Potentiel de formation du Biofilm
BPA	Biochimie des Produits Aquatiques
BRT	Biofilm Ring Test [®]
CECT	Spanish Type Culture Collection
CIP	Collection de l'Institut Pasteur
CMib	Concentration Minimale Inhibitrice du biofilm
CNPE	Centrale Nucléaire de Production d'Electricité
CPER MARCO	Contrat de plan État-Région de Recherches marines et littorales en Côte d'Opale
C _T	Cycle threshold
CV	Cristal Violet
DBHB	Dibromohemibastadin-1
DDH	Hybridation ADN-ADN
DGAL	Direction générale de l'alimentation
DO	Densité optique
DSMZ	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures
EEA	Agence Européenne de l'Environnement
EFSA	Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EPS	Substances Polymériques Extracellulaires
ESI	Electron Spray Ionization
EUMOFA	Observatoire Européen des Marchés des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture
FAFLP	Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
FEAMP	Fonds européen pour les affaires maritimes et la pêche
GE	Genome Equivalent
IFREMER	Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer
ISO	Organisation internationale de normalisation
IUCN	Union Internationale pour la Conservation de la Nature

LBS	Luria-Bertani Salé
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
LPSN	List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature
LSA	Laboratoire de Sécurité des Aliments
LUVIBAR	Lutte contre la vibriose du bar
MA	Marine agar
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry
MCT	Membranes et Cibles Thérapeutiques
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MedAID	Mediterranean Aquaculture Integrated Development
MLSA	MuliLocus Sequence Analysis
MLST	MultiLocus Sequence Typing
MSP	Mass Spectra Profile
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ND	Not detected
NGS	Next Generation Sequencing
NRL	National Reference Laboratory
NTC	No template control
OIE	Organisation Mondiale de la Santé Animale
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
pb	Paires de bases
PBE	<i>Piper betle</i> ethyl acetate extract
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
q-PCR	PCR quantitative
Qrr	Quorum regulatory RNA
QS	Quorum sensing
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
rep-PCR	repetitive extragenic palindromic PCR
RT-PCR	Reverse-Transcriptase PCR
Ta	Température d'hybridation
TCBS	Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose
TLH	Hémolysine Thermolabile
Tm	Température de fusion
UE	Union Européenne
UFC	Unité formant colonie
ULCO	Université du Littoral Côte d'Opale
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic mean
UV	Ultra-violet
VHA	<i>Vibrio harveyi</i> agar
VHH	<i>Vibrio harveyi</i> hémolysine
VHML	<i>Vibrio harveyi</i> myovirus-like
VHS1	<i>Vibrio harveyi</i> siphophage 1
VNC	Viable Non Cultivable
WoRMS	Word Register of Marine Species

Liste des Tableaux

Chapitre I

Tableau 1 : Exemples d'organismes affectant le bar commun en milieu aquacole, adapté de Jobling <i>et al.</i> , (2010).....	5
Tableau 2 : Liste d'espèces de <i>Vibrio</i> pouvant causer des maladies en milieu aquacole.....	37
Tableau 3 : Liste non exhaustive des espèces répertoriées sensibles à <i>Vibrio harveyi</i> en milieu aquacole.	40
Tableau 4 : Liste non exhaustive des différentes amorces, rencontrées dans la littérature, mises au point pour l'identification spécifique de <i>Vibrio harveyi</i>	58

Chapitre II (hors-publication)

Tableau 5 : Caractéristiques et analyse de spécificité <i>in silico</i> des séquences sens (forward, notées F) et antisens (reverse, notées R) mises au point. pb : paires de bases.....	77
Tableau 6 : Résultats d'amplification et analyse de la courbe de fusion des essais réalisés sur les 5 couples d'amorces. Les moyennes et les écarts types ont été obtenus à partir de triplicatas. pb : paires de bases.	79

Chapitre III (hors-publication)

Tableau 7 : Comparaison entre les résultats d'identification obtenus par MALDI-TOF MS en utilisant la base de données Bruker BioTyper ver. 9.0.0.0. et les résultats obtenus en utilisant la base de données Bruker BioTyper, implémentée avec la VibrioBase. Les 85 isolats utilisés ont été précédemment identifiés dans le <i>Chapitre II</i> , Article 1. Remplissage vert = identification identique à l'espèce attribuée, remplissage rouge = identification différente de l'espèce attribuée.....	119
--	-----

Chapitre IV (hors-publication)

Tableau 8 : Détail des caractéristiques morphologiques d'isolats collectés à partir de biofilms lors de la campagne d'échantillonnage, menée d'avril à octobre 2018.	187
---	-----

Discussion et perspectives

Tableau 9 : Comparaison des méthodes d'identification développées et/ou testées au cours de ces travaux de thèse.	198
--	-----

Liste des Figures

Introduction

Figure 1 : Productions halieutique et aquacole mondiale (FAO, 2018). 8

Chapitre I

Figure 2 : Photographie d'un bar commun (*Dicentrarchus labrax*) face latérale, 27 cm. 13

Figure 3 : Schéma représentant les différentes caractéristiques morphologiques du bar commun (*Dicentrarchus labrax*) et du bar tacheté (*Dicentrarchus punctatus*), adapté de Fischer *et al.*, (1981). 14

Figure 4 : Répartition géographique du bar commun *Dicentrarchus labrax* (Jobling *et al.*, 2010). 15

Figure 5 : Productions halieutique et aquacole du bar commun de 1950 à 2016 (selon les données de FAO FishStat, (2019)). 17

Figure 6 : Cycle de production du bar commun, inspiré de Jobling *et al.*, (2010) et Lucas *et al.*, (2019). 18

Figure 7 : Photographies d'élevages de bars communs. A. Elevage en cage de bars communs et de daurades royales en mer Egée, Grèce. Source: Jean Housen [CC BY-SA 3.0], *via* Wikimedia Commons. B. Elevage en bassin de bars communs sur les côtes du Nord de la France. 20

Figure 8 : Arbre phylogénétique basé sur la concaténation des séquences des gènes *ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *pyrH*, *recA*, et *topA*. Les différents clades de *Vibrio* sont représentés par des encadrés (Sawabe *et al.*, 2013). Les clades indiqués par une ligne rouge continue sont les nouveaux clades proposés lors de l'étude; les clades indiqués par une ligne pointillée rouge ou noire sont les clades modifiés ou inchangés respectivement lors de l'étude. 26

Figure 9 : Mécanismes de transfert horizontal de gènes adapté de McInnes *et al.*, (2020). 28

Figure 10 : Etapes de la formation d'un biofilm, adapté de Koo *et al.*, (2017). 33

Figure 11 : Schéma représentant les principaux mécanismes de tolérance et résistance aux antibactériens au sein d'un biofilm. Les bactéries (rectangle orange) sont incorporées dans la matrice (vert), fixées à un support (gris). Les mécanismes de résistance sont liés aux facteurs suivants : 1. Gradient de nutriments, avec moins de nutriments disponibles au centre du biofilm, générant une réduction du métabolisme bactérien et donc une diminution de la sensibilité aux antibactériens; 2. Matrice d'exopolysaccharides, limitant la diffusion de substances antibactériennes; 3. ADN extracellulaire, altérant l'environnement extracellulaire et impliqué dans le transfert horizontal de gènes; 4. Réponses au stress (stress oxydatif, réponse stringente); 5. Expression de gènes spécifiques au biofilm, dont les produits de gènes sont impliqués dans la réduction de la sensibilité aux antibactériens; 6. Pompe d'efflux, éliminant les antibactériens vers le milieu extracellulaire; 7. Interactions intercellulaires: quorum sensing, transfert horizontal de gènes... favorisant l'adaptation des bactéries; 8. Cellules en état VNC, moins sensibles aux antibactériens. Adapté de Hall et Mah, (2017). 34

Figure 12 : Photographies indiquant la morphologie des souches de <i>Vibrio harveyi</i> . A. Croissance de la souche VIB 391 sur marine agar 2216E ; B. Luminescence de la souche VIB 391 ; C. Croissance de la souche VIB 645 sur TCBS ; D. Microscopie électronique en transmission de la souche VIB 645 cultivée en marine broth, échelle = 1 μm (Zhang <i>et al.</i> , 2020).....	38
Figure 13 : Lésions anatomopathologiques chez le bar commun (<i>Dicentrarchus labrax</i>) résultant d'une infection volontaire à <i>V. harveyi</i> par immersion. A. Individus atteints de mélanose (flèche) comparés à des individus non atteints (tête de flèche). B. Ulcères cutanés et érosion de la nageoire caudale (flèche) avec exophtalmie (tête de flèche). C. Dilatation de l'intestin, entérite. Selon Pretto, (2018).....	42
Figure 14 : Quorum sensing de <i>Vibrio harveyi</i> et les mécanismes de virulence associés, adapté de Montánchez et Kaberdin, (2019).....	49
Figure 15 : Photographies de colonies sur milieu gélosé TCBS après incubation 24 h à 37 °C. A. Isolement d'eau de mer. B. Isolement de la souche <i>Vibrio harveyi</i> de référence LMG 4044. C. Isolement de la souche <i>Vibrio harveyi</i> de référence LMG 18298.....	52
Figure 16 : Schéma permettant de comparer le mécanisme de la technologie en sonde TaqMan® et SYBR® Green (adapté de Applied Biosystems, (2020)).....	56
Figure 17 : Schéma général représentant la préparation d'un échantillon bactérien dans le but d'une identification par la technique MALDI-TOF MS (Clark <i>et al.</i> , 2013).....	61
Figure 18 : Schéma général représentant la technique d'analyse d'un échantillon ionisé, par MALDI-TOF MS (Clark <i>et al.</i> , 2013).....	62
Figure 19 : Diagramme de Venn permettant de conceptualiser le déclenchement d'une maladie infectieuse selon une approche intégrative incluant l'hôte, l'agent pathogène et l'environnement. Issu de Snieszko, (1974)....	64
Figure 20 : Schéma conceptualisant le déclenchement d'une maladie infectieuse en aquaculture, ainsi que les stratégies de contrôle préconisées. Adapté de Pérez-Sánchez <i>et al.</i> , (2018) et Defoirdt <i>et al.</i> , (2011).	65
Chapitre II (hors-publication)	
Figure 21 : Courbes d'amplification et courbes de fusion obtenues à partir de 3 kits de pré-mix différents.	81
Figure 22 : Gel d'électrophorèse obtenu suite à la réalisation d'une gamme de températures d'hybridation allant de 55 °C à 65 °C.....	82
Figure 23 : Concentration de <i>V. harveyi</i> LMG 4044 récupérée en fonction des différents temps de sonication et de vortex testés. Deux concentrations initiales ont été testées 10 ⁴ UFC.mL ⁻¹ et 10 ² UFC.mL ⁻¹ . Les histogrammes représentent la moyenne de 3 répliquats et les barres d'erreurs représentent l'écart type.....	84
Figure 24 : Photographies des morceaux de béton et du dispositif permettant de les maintenir immergés 20 cm sous la surface de l'eau dans les bassins aquacoles contenant des bars communs d'élevage.....	85
Figure 25 : Photographies du gabarit, permettant d'écouvillonner une surface définie, et d'un morceau de béton avant et après écouvillonnage de la surface.	85

Figure 26 : Schéma de synthèse du Chapitre II, relatif au développement d'une PCR en temps réel pour la détection et la quantification de <i>Vibrio harveyi</i> en milieu aquacole.	115
Chapitre III (hors-publication)	
Figure 27 : Schéma de synthèse du Chapitre III, relatif au développement de la Luvibase, une base de données permettant l'identification par MALDI-TOF MS des espèces du clade Harveyi.	146
Chapitre IV (hors-publication)	
Figure 28 : Implantation et fonctionnement de la ferme aquacole Aquanord-Ichthus sur le site de Gravelines. A. Photographie aérienne de la ferme Aquanord-Ichthus (CNPE : Centrale Nucléaire de Production d'Electricité). B. Photographie des 3 bassins d'élevage utilisés lors de l'étude. C. Schéma du fonctionnement d'un module d'élevage sur Aquanord-Ichthus. Le canal d'alimentation est un mélange contrôlé d'eau chaude, provenant du canal de rejet de la CNPE (A.b.) et d'eau froide, provenant du canal d'aménée (A.a.), l'eau du canal d'évacuation est rejetée dans la mer du Nord.	149
Figure 29 : Pourcentage relatif de la DO ₅₉₀ des puits contenant une suspension bactérienne par rapport à la DO ₅₉₀ Contrôle du témoin négatif. Les valeurs indiquées représentent la moyenne de 18 mesures c'est-à-dire de 6 puits pour 3 différentes microplaques, les barres d'erreurs représentent les écarts types. Le signe « ++ » indique une capacité modérée à former des biofilms, « + » indique une faible capacité à former des biofilms, l'absence de marqueur indique que les souches ne sont pas capables de former des biofilms. Le nom des souches marqué par une « * » indique les souches utilisées pour mettre au point l'auto-vaccin sur Aquanord-Ichthus en 2018.	183
Figure 30 : Schéma du principe du Biofilm Ring Test [®] commercialisé par l'entreprise BioFilm Control [®]	185
Figure 31 : Résultats obtenus avec le Biofilm Ring Test [®] par BioFilm Control pour des isolats de <i>V. harveyi</i> . A. Résultats de l'étude de la cinétique d'adhésion avec A.a. le détail de la cinétique au cours du temps et A.b. le temps nécessaire aux bactéries pour former un biofilm. Chaque point des courbes représente la moyenne de 24 valeurs (4 puits pour 6 plaques), les barres d'erreurs représentent l'écart type. Une valeur de BFI élevée indique une forte mobilité des microbilles sous l'action de l'aimant, correspondant à l'absence de biofilm. Un BFI proche de 0 indique une immobilisation des microbilles suite à la formation d'un biofilm. B. Résultats de l'étude de la force d'adhésion du biofilm à 24 h. Les tests ont été réalisés en duplicatas.	188
Figure 32 : Schéma de synthèse du Chapitre IV, relatif à l'étude de la distribution spatiale et temporelle des Vibrionaceae et de l'espèce <i>Vibrio harveyi</i> dans un élevage de bars communs.....	190
Discussion et perspectives	
Figure 33 : Contribution du travail de thèse à une meilleure compréhension du risque <i>Vibrio</i> en environnement aquacole.	210

Introduction

*Give a person a fish and you feed them for a day;
Teach a person how to fish and you feed them for their life-time;
Teach a person how to grow fish and you feed them and their neighbours for their life-times.*

Aquaculture: farming aquatic animals and plants, 3rd edition.
John S. Lucas, Paul C. Southgate et Craig S. Tucker.
2019, John Wiley & Sons Ltd

Selon les prévisions de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), d'ici 2030, la part de l'aquaculture dans la production aquacole et halieutique mondiale, destinée ou non à l'alimentation, s'élèverait à plus de 54 % (FAO, 2018). Depuis une vingtaine d'années, la production halieutique stagne en raison d'une raréfaction des stocks naturels et de l'application de quotas dans certains pays (Fig. 1). Afin de garantir la sécurité alimentaire auprès d'une population croissante et de répondre à un récent engouement pour les denrées aquatiques, l'aquaculture s'est fortement développée. Avec l'émergence de nouvelles technologies et un meilleur contrôle dans le procédé de production, l'aquaculture moderne s'est répandue au détriment de l'aquaculture traditionnelle (Edwards, 2015). Ceci a entraîné une intensification et une diversification de la production aquacole à fort potentiel de rendement. Il en résulte une augmentation significative de la production aquacole depuis les années 50 (Fig. 1) (FAO, 2018).

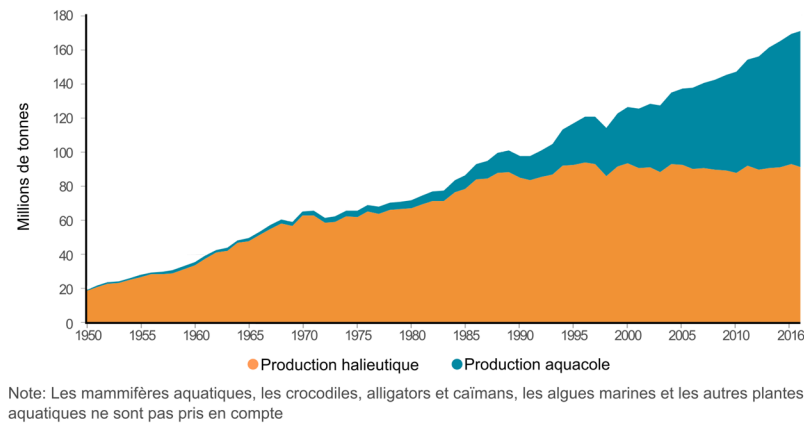


Figure 1 : Productions halieutique et aquacole mondiale (FAO, 2018).

C'est ainsi que le terme de « révolution bleue » a émergé dans les années 90, en référence à la « révolution verte » survenue dans le secteur agricole après la seconde guerre mondiale (Coull, 1993). A cette époque, l'intensification et la croissance rapide du secteur aquacole ont rapidement soulevé des inquiétudes relatives à la dégradation de l'environnement, à l'impact négatif sur la biodiversité et sur la santé publique. Plus particulièrement, la propagation du phénomène d'antibiorésistance, survenue suite à l'utilisation d'antibiotiques de manière excessive et inappropriée, est devenue une préoccupation majeure. Chaque année au niveau mondial, 700 000 décès sont attribués à des infections par des bactéries résistantes aux antibiotiques. D'ici 2050, ce chiffre pourrait atteindre les 10 millions, soit plus que le cancer (O'Neill, 2016).

Aujourd'hui, de nouvelles inquiétudes relatives à l'impact du réchauffement climatique émergent. En effet, ce dernier pourrait jouer un rôle catalyseur dans la répartition, la propagation et l'émergence de certaines maladies infectieuses, notamment en Europe (EEA, 2017). L'augmentation de la température des océans a entraîné une explosion de cas de vibriose, causée par les bactéries du genre *Vibrio* (Vezzulli *et al.*, 2015, Baker-Austin *et al.*, 2017, Froelich et Daines, 2020). Ces bactéries, ubiquitaires dans l'environnement aquatique, sont d'autant plus dangereuses qu'elles peuvent affecter une grande variété d'hôtes tels que les crustacés, les mollusques, les poissons ou encore l'Homme (Austin, 2010).

Dans ce contexte, l'EFSA encourage fortement la recherche sur les bactéries du genre *Vibrio* (EFSA, 2016). En effet, une meilleure compréhension des conséquences liées à l'émergence et la dynamique de nouvelles maladies est cruciale pour le développement de politiques de prévention et de contrôle responsables. Cette stratégie s'intègre dans le concept *One Health*, apparu dans les années 2000, visant à promouvoir une expertise collective pour lutter contre les problèmes sanitaires émergents. Celle-ci repose sur une approche holistique et intégrative incluant la santé animale, la santé humaine et l'environnement (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2018). Le concept *One Health* a notamment été reconnu comme un élément majeur dans le contrôle et la prévention des maladies par les agences internationales OIE - FAO - OMS (Organisation Mondiale de la Santé Animale - Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture - Organisation Mondiale de la santé) (Nuttall *et al.*, 2014).

L'impact socio-économique de la vibriose est encore mal connu. Ces dernières années, des mortalités massives, responsables de pertes économiques considérables, ont été constatées dans des élevages de crustacés, mollusques et poissons (Zhang *et al.*, 2014, Dong *et al.*, 2017, Rameshkumar *et al.*, 2017, Zhu *et al.*, 2018, King *et al.*, 2019). Plus particulièrement, en Europe, la vibriose est aujourd'hui la principale cause de mortalité chez le bar commun d'élevage (*Dicentrarchus labrax*), espèce à fort intérêt économique (Bostock *et al.*, 2016, Muniesa *et al.*, 2020). Pendant longtemps, l'agent pathogène, majoritairement recensé au sein des élevages, était l'espèce *Vibrio anguillarum*. Afin de lutter contre cet agent, des méthodes prophylactiques ont été développées et sont aujourd'hui appliquées. Récemment, l'espèce *Vibrio harveyi* est devenue un agent étiologique émergent, pour lequel aucun moyen de contrôle prophylactique, tels que les vaccins, n'est à ce jour commercialisé (Vendramin *et al.*, 2016, Dadar *et al.*, 2017).

Ainsi, cette thèse s'inscrit dans la problématique de la vibriose du bar commun d'élevage. Ces travaux ont été réalisés en partenariat avec la ferme aquacole Aquanord-Ichtus (Gravelines, France), subissant des épisodes de vibriose récurrents, majoritairement causés par *V. harveyi*. L'objectif consiste à apporter des éléments de compréhension, à travers la combinaison d'approches microbiologiques et moléculaires, visant à optimiser la gestion du risque *Vibrio* pour

le bar commun d'élevage, sur Aquanord-Ichtus. Cela implique une bonne connaissance de la dynamique spatio-temporelle des bactéries, potentiellement pathogènes, au sein de cette ferme. En effet, leur comportement ainsi que leur capacité de persistance et de multiplication déterminent, en partie, leur impact sur l'environnement et plus particulièrement sur les poissons. Ces comportements bactériens sont eux-mêmes influencés par des facteurs environnementaux biotiques et/ou abiotiques.

Afin de répondre à ces objectifs, mes travaux de thèse reposent, dans un premier temps, sur la conception d'outils et de méthodes de détection et d'identification, dans une perspective de surveillance et de suivi environnemental. Ce suivi a ensuite été réalisé, dans un second temps, *via* l'étude de la dynamique spatio-temporelle des Vibrionaceae et plus particulièrement de *V. harveyi* au sein d'Aquanord-Ichtus. Ce manuscrit de thèse s'articule autour de 4 chapitres :

- **Chapitre I** : ce chapitre fait état des connaissances actuelles sur l'élevage du bar commun, les problèmes de vibriose, particulièrement liés à l'espèce *V. harveyi*, ainsi que les méthodes de diagnostic et de lutte couramment utilisées et émergentes.
- **Chapitre II et III** : ces deux chapitres ont pour objectif la mise au point d'outils et de méthodes de détection et d'identification. Le **Chapitre II** présente une méthode de PCR en temps réel, permettant de quantifier l'espèce *V. harveyi* dans l'eau d'élevage et les biofilms formés dans les bassins d'Aquanord-Ichtus. Le **Chapitre III** décrit la conception de la Luvibase, une base de données de profils de spectres de masse, permettant d'identifier les espèces du clade Harveyi par MALDI-TOF MS.
- **Chapitre IV** : ce chapitre est consacré à l'étude de la distribution spatio-temporelle des Vibrionaceae cultivables à 37 °C, et plus particulièrement de *V. harveyi*, sous forme planctonique et de biofilm, *via* une campagne d'échantillonnage réalisée d'avril à octobre 2018 au sein d'Aquanord-Ichtus. Les outils et méthodes présentés dans les **Chapitre II** et **III** sont ici mis en application et les résultats ont été considérés en tenant compte des facteurs environnementaux.

Ces chapitres sont suivis d'une discussion générale concernant l'ensemble des résultats et faisant état des perspectives qui en découlent.

Chapitre I.

Contexte scientifique et économique

Sommaire

1.	L'aquaculture du bar commun : <i>Dicentrarchus labrax</i>	13
1.1.	Systématique et caractéristiques biologiques.....	13
1.2.	Marché et réglementation	15
1.3.	L'élevage du bar commun	17
1.3.1.	Prérequis	17
1.3.2.	La production d'écloserie.....	18
1.3.3.	Les unités de grossissement	19
1.4.	Les challenges d'aujourd'hui	21
2.	Les bactéries du genre <i>Vibrio</i>	24
2.1.	Systématique et caractéristiques des <i>Vibrio</i>	24
2.1.1.	Historique et taxonomie	24
2.1.2.	Caractéristiques génétiques.....	27
2.1.3.	Caractéristiques biologiques, habitat et dynamique	28
2.2.	La stratégie d'adaptation des <i>Vibrio</i>	30
2.2.1.	L'état viable non cultivable (VNC).....	30
2.2.2.	Les biofilms bactériens.....	31
2.3.	Les interactions hôte – <i>Vibrio</i>	35
2.3.1.	Les relations symbiotiques.....	35
2.3.2.	Les principales espèces pathogènes pour l'Homme	35
2.3.3.	Les espèces pathogènes recensées en milieu aquacole.....	36
3.	L'espèce <i>Vibrio harveyi</i>	38
3.1.	Historique et taxonomie.....	38
3.2.	Maladies associées à l'espèce <i>Vibrio harveyi</i>	39
3.2.1.	Les espèces sensibles	39
3.2.2.	Les signes cliniques chez le bar commun.....	42
3.3.	Pathogénie et virulence.....	42
3.3.1.	Infection et colonisation d'un hôte.....	43

3.3.2.	Multiplication et dommages tissulaires	45
3.3.3.	Régulation de l'expression et transfert des facteurs de virulence	47
4.	Méthodes de détection et d'identification de <i>Vibrio harveyi</i>	51
4.1.	Méthodes culturales de croissance et identification phénotypique	52
4.2.	Techniques de biologie moléculaire	54
4.3.	Analyse protéomique par MALDI-TOF MS.....	60
5.	Les moyens de lutte contre la vibriose en aquaculture	63
5.1.	Principes de gestion des maladies en milieu aquacole.....	63
5.1.1.	Déclenchement des maladies.....	63
5.1.2.	Une stratégie de contrôle holistique.....	64
5.2.	Les mesures de contrôle appliquées à ce jour	65
5.2.1.	Les pratiques de préventions généralisées	65
5.2.2.	Les antibiotiques	66
5.2.3.	Les vaccins et immunostimulants	67
5.3.	Les mesures de contrôle alternatives.....	69
5.3.1.	Les probiotiques	69
5.3.2.	Les bactériophages.....	70
5.3.3.	Les composés anti-biofilms	71
5.3.4.	Les revêtements antifouling.....	72

1. L'aquaculture du bar commun : *Dicentrarchus labrax*

1.1. Systématique et caractéristiques biologiques



Figure 2 : Photographie d'un bar commun (*Dicentrarchus labrax*) face latérale, 27 cm.

À ce jour, d'après le site WoRMS (Word Register of Marine Species) ([WoRMS, 2019](#)), la classification du bar commun (*Dicentrarchus labrax*) est la suivante :

Règne : Animalia

Embranchement : Chordata

Sous-embranchement : Vertebrata

Super-classe : Gnathostomata

Classe : Actinopterygii

Ordre : Perciformes

Sous-ordre : Percoidei

Famille : Moronidae

Genre : *Dicentrarchus* (Gill, 1860)

Espèce : *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758)

Le bar commun (Fig. 2), également appelé bar ou loup sur les côtes méditerranéennes, appartient au genre *Dicentrarchus*. Les espèces de ce genre sont caractérisées, par un corps allongé de couleur majoritairement argentée, avec une bouche modérément protractile. L'opercule est formé de deux épines et le préopercule est dentelé. Elles possèdent deux nageoires dorsales distinctes ; la première, comptant huit à dix épines, la deuxième, comptant une épine et onze à quatorze rayons

mous (Fischer *et al.*, 1981). Le genre *Dicentrarchus* regroupe seulement deux espèces : le bar commun *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) et le bar tacheté *Dicentrarchus punctatus* (Bloch, 1792). Ces deux espèces sont régulièrement confondues. Il existe toutefois des caractéristiques morphologiques permettant de les distinguer (Fig. 3). L'espèce *D. labrax* adulte ne présente pas de taches noires sur le corps contrairement aux individus *D. punctatus* juvéniles et adultes. De même, l'espèce *D. labrax* présente des dents seulement sur la partie antérieure du vomer, alors que l'espèce *D. punctatus* présente des dents sur tout le vomer (Quéro et Vayne, 1997).

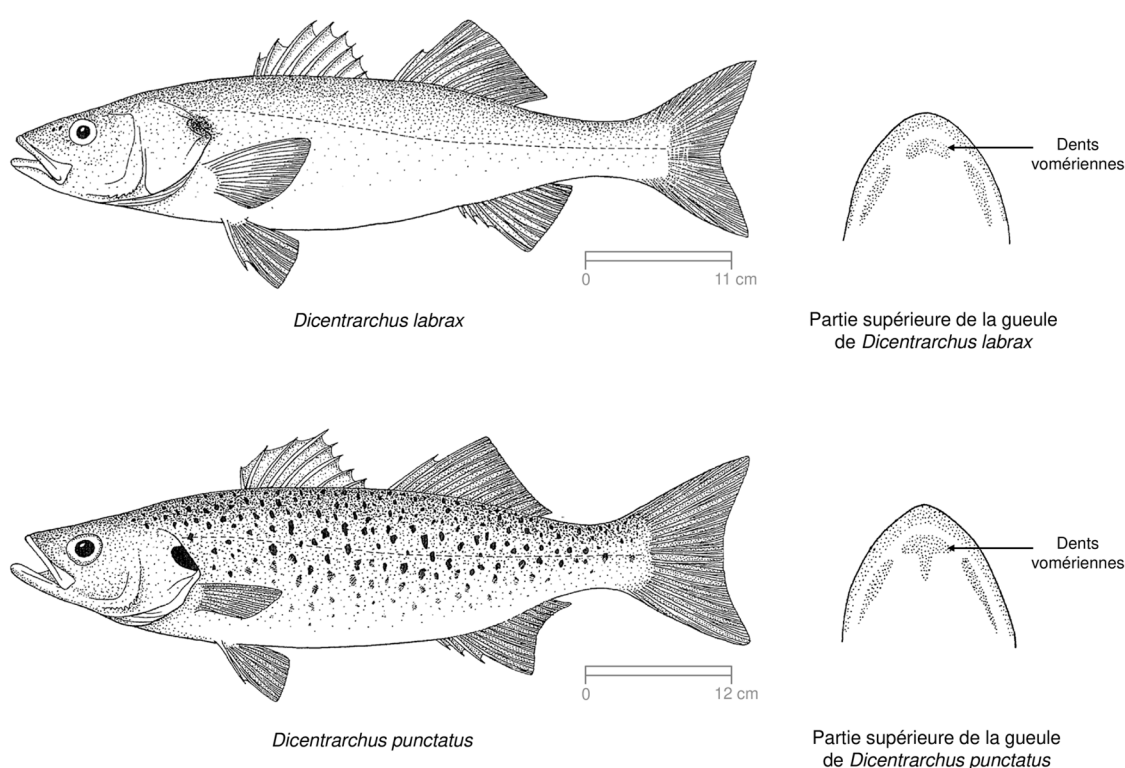


Figure 3 : Schéma représentant les différentes caractéristiques morphologiques du bar commun (*Dicentrarchus labrax*) et du bar tacheté (*Dicentrarchus punctatus*), adapté de Fischer *et al.* (1981).

Le bar commun est une espèce généralement côtière. Il est à la fois benthique et pélagique. Cette espèce est eurytherme, c'est-à-dire capable de s'adapter à de grandes variations de températures : de 2 °C à 32 °C. Elle est également euryhaline, c'est-à-dire capable de s'adapter à de grandes variations de salinité : de 0,5 à 40 (Pérez-Ruzafa et Marcos, 2014). Ces caractéristiques permettent d'expliquer sa vaste répartition géographique en Europe. Le bar est présent sur les

côtes Nord-Est de l'Atlantique, du Maroc jusqu'à la Norvège. Il est présent en mer du Nord, en mer d'Irlande et en mer Baltique. Il est également retrouvé en Méditerranée ainsi qu'en mer Noire (Fig. 4). Au niveau génétique, les populations naturelles peuvent être divisées en trois groupes distincts : Atlantique, Est-méditerranéen, et Ouest-méditerranéen (Naciri *et al.*, 1999, Bahri-Sfar *et al.*, 2000).



Figure 4 : Répartition géographique du bar commun *Dicentrarchus labrax* (Jobling *et al.*, 2010).

Le bar commun est un prédateur vorace, adaptable et opportuniste. Les juvéniles se nourrissent principalement de zooplancton et d'invertébrés alors que les adultes peuvent se nourrir de vers, crevettes, mollusques et petits poissons.

Le bar commun est une espèce gonochoristique. En général, les mâles et les femelles atteignent respectivement la maturité sexuelle à partir de 2 et 3 ans. La période de fraie est saisonnière et n'a lieu qu'une fois par an. Les œufs sont pélagiques et la fécondation est externe. Un individu adulte peut atteindre 9-10 kg voire 15 kg et posséder une longévité de plus de 20 ans (Pérez-Ruzafa et Marcos, 2014).

1.2. Marché et réglementation

La consommation de bar commun en Europe Le bar commun est aujourd'hui considéré comme un mets délicat. C'est une espèce prisée par les consommateurs et les restaurateurs. De par son caractère combatif, il suscite également de l'intérêt chez les pêcheurs

de loisir. En 2016, en moyenne, en Europe, la consommation par an par habitant était de 200 g. Le bar sauvage est considéré comme un produit haut de gamme, dont le prix peut atteindre les 25 €/kg, alors que le prix du bar d'élevage est en moyenne autour des 10 €/kg. Le bar sauvage sera donc principalement apprécié des poissonniers et restaurateurs. Le bar d'élevage sera majoritairement présent en grande distribution pour une consommation individuelle des ménages (EUMOFA, 2019).

La production halieutique Au cours de ces dix dernières années, les captures mondiales de bar commun ont fortement diminué (-46 %). Ceci s'explique par une diminution des stocks naturels, notamment dans l'Atlantique Nord, suite à une importante pression de pêche et une diminution de la reproduction (EUMOFA, 2019). Celle-ci est fortement perturbée en raison de la pollution et de la destruction de l'habitat naturel. D'après les données de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (IUCN), le bar commun est aujourd'hui classé sur liste rouge dans la catégorie « quasi-menacée », en Méditerranée (Yokes, 2011). Ce contexte a entraîné la mise en place de mesures de contrôle. Ainsi en 2015, l'Union Européenne (UE) a instauré une nouvelle réglementation visant à protéger les stocks naturels de bar commun. Cette mesure regroupe la limitation de la pêche au chalut, l'instauration de quotas, de zones de pêche, d'une période d'autorisation de capture, d'une taille minimale de capture.

La production aquacole Historiquement, l'élevage de bars communs a débuté en Europe dans les années 70. Cet élevage était principalement lagunaire avec des juvéniles issus du milieu naturel. La production s'est particulièrement améliorée grâce aux progrès zootechniques et au développement de nouvelles technologies. Ainsi, cette production est en constante augmentation depuis les années 90 (Fig. 5). Ces dernières années, la production aquacole a atteint les 190 000 tonnes par an alors que la production halieutique se situait autour de 6 000 tonnes seulement (Fig. 5). Le bar commun est devenu l'espèce piscicole la plus produite en Méditerranée. L'UE est aujourd'hui leader du marché avec plus de 50 % de la production provenant de Grèce, suivie de l'Espagne (28 %), l'Italie (8 %), la Croatie (6 %), la France (3 %) et Chypre (2 %). Ces dernières années, une concurrence émerge de la Turquie avec des prix défilants toute concurrence (FAO,

2018, EUMOFA, 2019, 2020). En France, en 2018 la production aquacole correspondait à plus de 63 % de la production totale française, soit une augmentation de 11 % par rapport à 2010 (FranceAgriMer, 2010, FranceAgriMer, 2018).

Production mondiale de bar commun (*Dicentrarchus labrax*)

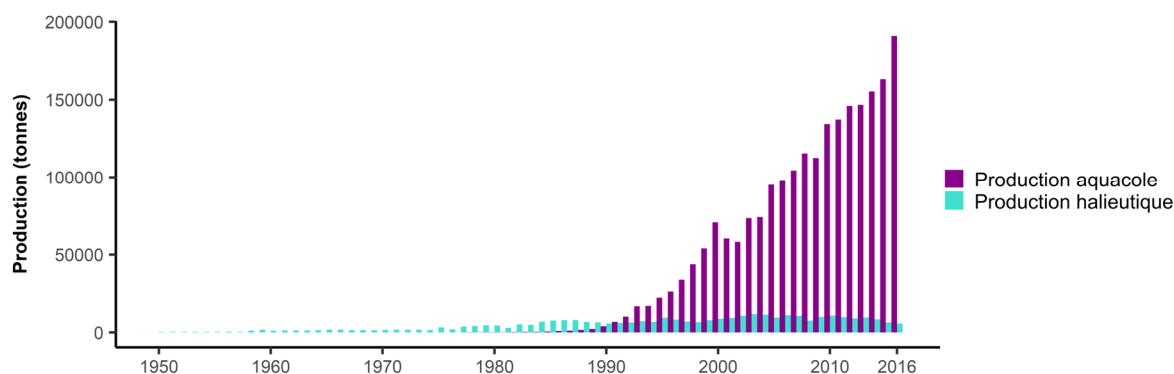


Figure 5 : Productions halieutique et aquacole du bar commun de 1950 à 2016 (selon les données de [FAO FishStat \(2019\)](#)).

1.3. L'élevage du bar commun

1.3.1. Prérequis

Par définition, l'aquaculture signifie l'élevage d'organismes aquatiques tels que les crustacés, les mollusques, les poissons et les plantes. Le terme « aquaculture » implique l'intervention de l'Homme dans le processus de production et la propriété du stock d'élevage (Lucas *et al.*, 2019).

Un système aquacole se caractérise selon trois paramètres :

- **La structure**, c'est-à-dire l'architecture dans laquelle les organismes sont élevés. Il peut s'agir de piscines, bassins, cages, filets, parcs...
- **Le renouvellement d'eau**. Il peut être statique, pas de renouvellement d'eau ; ouvert, les cages sont placées dans une grande quantité d'eau (lac, océan) de sorte que le renouvellement s'effectue exclusivement grâce aux flux naturels ; semi-fermé, un flux d'eau provenant d'une source externe est apporté à la ferme pour maintenir la qualité de

l'eau ; ou fermé, système de recirculation d'eau dont la connexion avec l'environnement est minime.

- **L'intensité.** Une activité intensive est caractérisée par un contrôle de la nutrition et de l'environnement, ainsi qu'un rendement par unité d'aire élevé. Par opposition, un système extensif est intégré dans un écosystème naturel. Il en résulte un faible contrôle de la nutrition et de l'environnement, ainsi qu'un rendement par unité d'aire limité. Le système semi-intensif est un système intermédiaire dépendant majoritairement de l'écosystème naturel, auquel des fertilisants, de l'oxygène ou des nutriments sont apportés en complément.

Les systèmes d'élevage du bar commun sont généralement intensifs. Ainsi, seul ce système sera détaillé ici.

1.3.2. La production d'écloserie

Il existe deux phases majeures lors de l'élevage : la phase de production de juvéniles en écloserie et la phase de grossissement de juvéniles (Fig. 6).

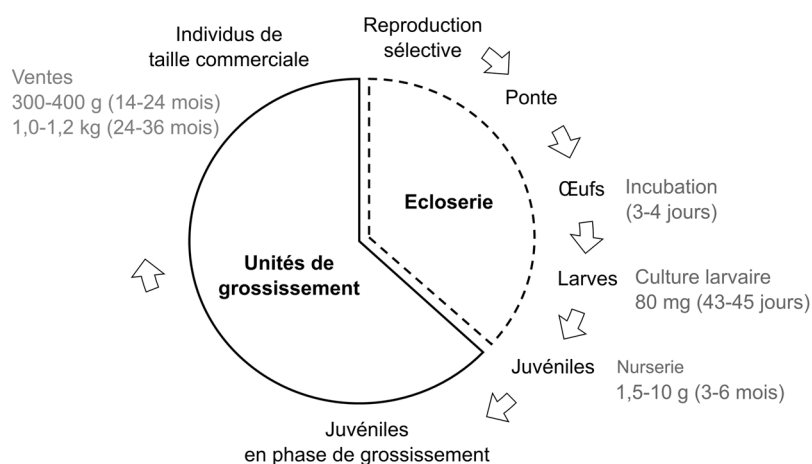


Figure 6 : Cycle de production du bar commun, inspiré de Jobling *et al.* (2010) et Lucas *et al.* (2019).

Géniteurs et ponte Les géniteurs sont des individus adultes ayant atteint la maturité sexuelle (2-4 ans pour les mâles, 5-8 ans pour les femelles), issus de captures sauvages ou de

l'élevage (Jobling *et al.*, 2010). Depuis les années 80, des programmes de reproduction sélective sont en cours en France, Espagne, Italie et Israël afin d'améliorer la croissance, la morphologie, la résistance aux maladies et le rendement. Chez le bar commun, la période de fraie est de novembre à mars. Toutefois, les écloséries sont en mesure de provoquer cette période grâce au contrôle des paramètres environnementaux (température, photopériode) ou l'usage d'hormones. La fertilisation des œufs a lieu de façon naturelle dans des bassins de fraie en maintenant un ratio de deux mâles pour une femelle. Les œufs fertilisés sont ensuite incubés pendant 3-4 jours jusqu'à l'éclosion (Lucas *et al.*, 2019).

La culture larvaire Les larves viables sont ensuite sélectionnées et transférées au système de culture larvaire. La culture larvaire repose sur un contrôle strict de la lumière, de la température et de la salinité. Pendant les 3-4 premiers jours, les larves se nourrissent des restes de sac vitellin. Elles sont ensuite nourries avec une quantité croissante de proies vivantes telles que les rotifères (*Brachionus plicatilis*) et les nauplius de crevettes saumâtres (*Artemia salina*) (Jobling *et al.*, 2010, Lucas *et al.*, 2019).

La nurserie Les juvéniles, c'est-à-dire les individus d'environ 43 à 45 jours et pesant environ 80 mg, sont ensuite sélectionnés et transférés vers le système de nurserie. Les organismes sont sevrés progressivement par incorporation de nourriture inerte dans leur régime. Les juvéniles sont maintenus en nurserie pendant 3 à 6 mois pour atteindre un poids de 1,5 à 10 g. A la fin de ce stade, les juvéniles sont entièrement nourris par des aliments desséchés et sont aptes à rejoindre la phase de grossissement (Lucas *et al.*, 2019).

1.3.3. Les unités de grossissement

Les juvéniles, qui arrivent en unités de grossissement, sont classés en fonction de leur taille. Au cours de cette phase, les individus sont régulièrement triés afin d'éviter une variation de taille ainsi que le cannibalisme. Les individus sont nourris une à deux fois par jour avec des aliments sous forme de granules contenant des protéines (35-50 %) et des lipides (10-26 %). Les systèmes

d'élevage du bar commun sont majoritairement *offshore*. Toutefois, le nombre de fermes aquacoles *onshore* augmente (Lucas *et al.*, 2019).

L'élevage *offshore* L'élevage *offshore* (Fig. 7.A) est un système ouvert dans lequel les bars sont maintenus dans des cages ou des filets placés en pleine mer. Ces compartiments peuvent atteindre 25 m de diamètre et 10 m de profondeur. La densité de poisson est d'environ 20 kg.m^{-3} . L'avantage de ce système repose sur la réduction des coûts de production. Le renouvellement d'eau se fait grâce aux courants naturels de sorte qu'aucun coût n'est engagé pour le maintien de la qualité de l'eau. Néanmoins, le contrôle des paramètres environnementaux est limité. La qualité de l'eau dépend uniquement des facteurs externes et peut difficilement être contrôlée. Les systèmes ouverts sont également plus sujets à la prédation.

L'élevage *onshore* L'élevage *onshore* (Fig. 7.B) est un système fermé ou semi-fermé dans lequel les bars sont élevés dans des bassins ou *raceway*. La densité de poissons est d'environ 50 kg.m^{-3} . Ce type d'élevage fournit aujourd'hui plus de la moitié de la production de bars communs. Les avantages de ce système sont un rendement accru ainsi qu'un contrôle total des paramètres environnementaux. Les fermes peuvent ainsi s'implanter dans des zones diverses, indépendamment des facteurs environnementaux. Toutefois, il en résulte un coût de construction et de production plus élevé.

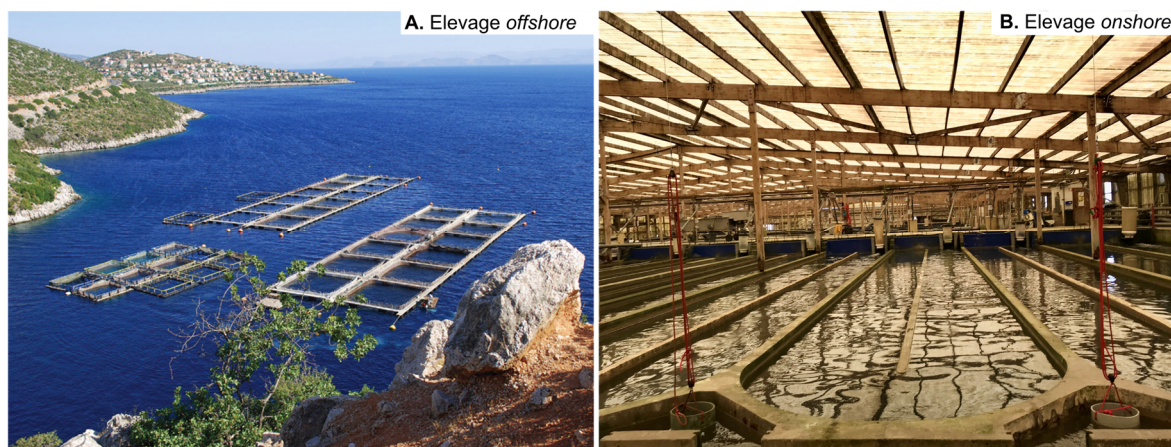


Figure 7 : Photographies d'élevages de bars communs. A. Elevage en cage de bars communs et de daurades royales en mer Egée, Grèce. Source: Jean Housen [CC BY-SA 3.0], *via* Wikimedia Commons. B. Elevage en bassin de bars communs sur les côtes du Nord de la France.

1.4. Les challenges d'aujourd'hui

Aujourd'hui l'aquaculture du bar commun fait face à plusieurs enjeux dont le primordial consiste à réduire les coûts tout en maintenant une qualité et une vitesse de production pouvant répondre aux besoins du marché.

Amélioration par contrôle du sexe et de la maturation L'un des problèmes majeurs que rencontre l'élevage de bars communs est la prédominance des individus mâles par rapport aux individus femelles (> 75 %). Les mâles grossissent moins vite que les femelles et atteignent la maturité plus rapidement. Certains pourraient même devenir matures avant d'atteindre la taille de vente requise. D'un point de vue industriel, cela se traduit par une diminution de rendement. Ce déterminisme sexuel est dû à des facteurs génétiques ainsi qu'à des facteurs environnementaux (température) appliqués lors des stades précoces du développement (Piferrer *et al.*, 2005). A ce jour, bien que des manipulations permettent d'améliorer le ratio femelles/mâles aucun procédé n'a été développé pour obtenir des populations « mono-sexe » propres à la consommation (Vandeputte et Piferrer, 2019).

La sélection génétique Ces dernières années de nombreux progrès ont été réalisés dans le domaine de la sélection génétique. Aujourd'hui, la part d'entreprises aquacoles européennes, toutes espèces confondues, ayant recours à ce procédé atteint les 80 à 83 % (Janssen *et al.*, 2017). Celle-ci repose sur la sélection de caractères héréditaires jugés bénéfiques dans le cas de la production aquacole. Par exemple, le poids des bars communs à taille commerciale peut être augmenté de 25 à 30 % par génération en sélectionnant les individus les plus lourds, le poids étant, dans une certaine mesure, un caractère héréditaire (Dupont-Nivet *et al.*, 2008). Ce procédé est toutefois long dans la mesure où des résultats satisfaisants ne sont visibles qu'au bout de plusieurs générations (Janssen *et al.*, 2017). Des études de création d'un hybride entre les deux espèces, *D. labrax* et *D. punctatus* ont également été mises en place. L'objectif était d'induire une hétérosis bénéfique à la production aquacole. Cet hybride a ainsi démontré des avantages, tels qu'une amélioration de la survie au cours des stades précoces du développement, par rapport aux

lignées parentales (Ky *et al.*, 2012). Néanmoins, d'un point de vue commercial, les hybrides sont de moindre valeur.

L'alimentation Le système de nutrition est également un facteur important ayant un impact sur le rendement. De nombreuses études ont été réalisées afin de mesurer l'impact du régime alimentaire et de ses conditions d'administration. Ces derniers ont une influence sur la vitesse de grossissement, la qualité des filets et le système immunitaire (Kousoulaki *et al.*, 2015). Les aliments retrouvés dans le commerce sont principalement formulés à base de protéines animales (farine de poissons) et/ou végétales. Aujourd'hui, des alternatives émergent avec l'apparition de protéines d'insectes. L'utilisation de ces protéines a montré des résultats prometteurs pour l'élevage du bar commun (Basto *et al.*, 2020). Cependant, ces protéines ne sont pas encore autorisées en France.

Les maladies Plusieurs organismes peuvent affecter les bars communs : les bactéries, les virus, les parasites protistes et les parasites métazoaires (Jobling *et al.*, 2010). En milieu aquacole, ces organismes peuvent altérer la qualité ou engendrer des mortalités massives. Ceux-ci engendrent des pertes économiques considérables. Un recensement de quelques espèces rencontrées chez le bar commun d'élevage est fourni dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Exemples d'organismes affectant le bar commun en milieu aquacole, adapté de Jobling *et al.* (2010).

Organismes	Espèces	Maladie	Signes cliniques	Méthode prophylactique	Méthode curative	Références
Bactéries	<i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>V. anguillarum</i> , <i>V. harveyi</i> , <i>V. ordalii</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. vulnificus</i>	Vibriose	Léthargie, exophthalmie, ulcères et lésions cutanées, hémorragies internes, ascite, pâleur du rein et du foie. Mortalité	Vaccination	Antibiotiques	(Le Breton, 1999, Ghittino <i>et al.</i> , 2003, Kahla-Nakbi <i>et al.</i> , 2006, Korun et Timur, 2008, Khouadja <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	Pasteurellose	Septicémie hémorragique, nécrose des branchies, des reins, du foie, et de la rate. Mortalité	Vaccination	Antibiotiques	(Magariños <i>et al.</i> , 1996)
	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	Photobactériose	Septicémie, ulcères cutanés, hémorragies	-	-	(Khouadja <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Tenacibaculum maritimum</i>	Tenacibaculose	Ulcères et lésions cutanées, nécrose des branchies, exophthalmie, hémorragies internes	-	-	(Yardimci et Timur, 2015)
	<i>Mycobacterium marinum</i>	Mycobactériose	Inflammation granulomateuse au niveau des organes internes tels que la rate et les reins. Mortalité	-	Pas de traitement efficace	(Knibb <i>et al.</i> , 1993, Colorni <i>et al.</i> , 1998)
Virus	Nodavirus	Encéphalite virale	Mouvements désordonnés, perte d'équilibre. Mortalité massive	-	Pas de traitement efficace	(Frerichs <i>et al.</i> , 1996)
Parasites protistes	<i>Amyloodinium ocellatum</i>	Amyloodiniose (maladie du velours)	Aspect poudré ou de velours de la peau, perte d'appétit, détresse respiratoire. Mortalité	-	Parasiticide (formaline, sulfate de cuivre...) ou immersion en eau douce durant quelques minutes	(Francis-Floyd et Floyd, 2011)
	<i>Cryptocaryon irritans</i>	Cryptocaryonose (maladie des points blanc)	Hyperproduction de mucus, décoloration de la peau, présence de nodules blanchâtres sur la peau, perte d'appétit, détresse respiratoire. Mortalité	-	Parasiticide (formaline, sulfate de cuivre...) ou immersion en eau douce durant quelques minutes	(Colorni et Burgess, 1997, Fioravanti <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Sphaerospora dicentrarchi</i> , <i>S. testicularis</i>	Myxosporidiose	Infestation de l'intestin, des reins, de la vésicule biliaire. Faible mortalité résultant de maladies opportunistes	-	Pas de traitement efficace	(Fioravanti <i>et al.</i> , 2004)
	Copépodes et isopodes	Maladie des pous de mer	Infestation des branchies, de la peau et de la cavité buccale, lésions. Mortalité	-	Parasiticide	(Vagianou <i>et al.</i> , 2006)
Parasites métazoaires	<i>Diplectanum aequans</i> , <i>D. laubieri</i>	Diplectanose	Infestation des branchies, nécroses. Mortalité	-	Parasiticide	(González-Lanza <i>et al.</i> , 1991)

Les données épidémiologiques relatives aux maladies affectant le bar commun d'élevage sont rares. En effet, à ce jour celui-ci ne fait pas partie des espèces sensibles aux maladies à déclaration obligatoire énumérées dans la directive du conseil européen 2006/88/EC (EU, 2006). Toutefois, afin de pallier ce manque et d'améliorer les performances du secteur aquacole méditerranéen, un projet européen nommé MedAID (Mediterranean Aquaculture Integrated Development) a vu le jour dans le cadre d'Horizon 2020. Il en découle une récente étude regroupant des fermes aquacoles de Croatie, Chypre, France, Grèce, Espagne, Tunisie et Turquie. Les résultats ont permis de dresser un tableau des maladies à fortes répercussions sur le secteur aquacole du bar commun grâce à des données collectées de 2015 à 2017. Le taux de survie lors de la phase de grossissement était de 85 %. Au total, 10 % des individus sont morts suite à la contraction de maladies. Il a été démontré que 75 % des pathologies étaient d'origine bactérienne. La vibriose était la pathologie la plus commune suivie de la tenacibaculose et de la photobacteriose. La vibriose a été observée sur tout le processus d'élevage, de l'écloserie jusqu'à la phase de grossissement, alors que la tenacibaculose et la photobacteriose étaient plus particulièrement observées lors de la phase de grossissement. Ainsi la vibriose, qui est une pathologie causée par les bactéries du genre *Vibrio*, est la pathologie la plus fréquemment rencontrée chez le bar commun d'élevage (Muniesa *et al.*, 2020).

2. Les bactéries du genre *Vibrio*

2.1. Systématique et caractéristiques des *Vibrio*

2.1.1. Historique et taxonomie

En 1854, la première espèce du genre *Vibrio* : *Vibrio cholerae* (Pacini, 1854), a été découverte par l'Italien Filippo Pacini. Celle-ci a été détectée par analyse microscopique des muqueuses intestinales de patients victimes du choléra. Ce n'est qu'en 1883 que l'espèce *V. cholerae* a été isolée sur milieu gélosé par l'Allemand Robert Koch. Cette bactérie a alors été identifiée comme l'agent responsable du choléra (Thompson *et al.*, 2004a).

A cette époque et jusqu'à la moitié du XX^e siècle, la taxonomie des *Vibrio* était établie selon des critères phénotypiques (Alsina et Blanch, 1994). Ces critères se sont avérés insuffisants quant à la discrimination d'une souche à l'espèce. En effet, certaines souches de *Vibrio*, appartenant à différentes espèces, possèdent un phénotype similaire. C'est notamment le cas pour les espèces *Vibrio campbellii*, *Vibrio rotiferianus* et *Vibrio harveyi* (Thompson et Swings, 2006). Le développement d'outils moléculaires a alors été nécessaire pour édifier une taxonomie polyphasique fiable, établie selon des critères génétiques et phylogéniques, en complément des données phénotypiques (Vandamme et al., 1996). Ainsi, le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S a permis de clarifier la taxonomie des *Vibrio* (Dorsch et al., 1992). Néanmoins, les séquences de gènes de l'ARNr 16S étant très conservées au sein des *Vibrio*, cette technique permet uniquement une identification fiable à la famille et au genre. Par exemple, les espèces, *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio rotiferianus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* et *Vibrio natriegens* partagent 97,6 % de similarité au niveau de cette séquence, les rendant difficilement distinguables (Dorsch et al., 1992). L'identification à l'espèce a été possible par combinaison des méthodes d'hybridation ADN-ADN, rep-PCR et d'amplification sélective des fragments d'ADN de restriction ou AFLP (Amplified Fragment-Length Polymorphism) (Thompson et al., 2004a). La classification a ensuite été affinée grâce au développement de méthodes d'analyse de séquences de gènes de ménage ou MLSA (MultiLocus Sequence Analysis) (Thompson et al., 2005). Par exemple, ces méthodes ont permis de reclasser certaines souches identifiées en tant que *V. harveyi*, comme étant des souches appartenant aux espèces *Vibrio campbellii* et *Vibrio owensii*. Il s'est également avéré que les espèces *Vibrio owensii* et *Vibrio communis* étaient en réalité la même espèce (Hoffmann et al., 2012).

Il semble ainsi délicat d'établir une taxonomie précise des bactéries du genre *Vibrio*, celle-ci étant, jusqu'à présent, en constante évolution. Néanmoins, d'après la dernière mise à jour du Bergey's Manuel of Systematics of Archea and Bacteria (Farmer et al., 2015), la classification des bactéries du genre *Vibrio* est la suivante :

2.1.2. Caractéristiques génétiques

Contrairement à la majorité des bactéries, la plupart des souches de *Vibrio* décrites à ce jour possèdent deux chromosomes circulaires de tailles différentes (Trucksis *et al.*, 1998, Yamaichi *et al.*, 1999, Chen *et al.*, 2003, Makino *et al.*, 2003, Okada *et al.*, 2005). Le chromosome I ou grand chromosome (3 à 4 Mégabases, Mb), semble être relativement bien conservé parmi les différentes espèces de *Vibrio* alors que le chromosome II ou petit chromosome (0,8 à 2,4 Mb), est plus variable (Okada *et al.*, 2005). Le chromosome I renferme la plupart des gènes essentiels à la croissance, la réplication et la virulence (Heidelberg *et al.*, 2000). Le chromosome II renferme en partie des gènes impliqués dans la survie et l'adaptation aux conditions environnementales (Xu *et al.*, 2003). Ainsi, ces deux chromosomes remplissent des fonctions distinctes. Plusieurs théories tentent d'expliquer l'origine du chromosome II. Selon la première, ce serait le résultat de l'acquisition ancestrale d'un mégaplasme par transfert horizontal (Heidelberg *et al.*, 2000). Selon la deuxième, ce serait le résultat d'une excision ancestrale du génome (Waldor *et RayChaudhuri*, 2000). Toutefois il existe des exceptions : des études récentes ont mis en évidence la présence de souches environnementales de *V. cholerae* possédant un seul chromosome apparenté à la fusion des chromosomes I et II (Xie *et al.*, 2017).

Les bactéries du genre *Vibrio* sont capables d'acquérir du matériel génétique exogène *via* transfert horizontal de gènes. Celui-ci se définit par une assimilation d'ADN, de source exogène, dans le génome d'un organisme. Il est en opposition avec le transfert vertical de gènes, c'est-à-dire l'acquisition de caractères génétiques *via* une cellule parentale (Boucher *et Stokes*, 2006). Il existe plusieurs modes de transfert horizontal de gènes ; la conjugaison, c'est-à-dire le transfert par contact cellules-cellules ; la transformation, c'est-à-dire l'intégration d'ADN libre exogène dans le génome d'une cellule dite compétente ; la transduction, c'est-à-dire le transfert de gènes par l'intermédiaire d'un phage ; ou encore l'intégration d'ADN par fusion membranaire de vésicules lipidiques (Fig. 9).

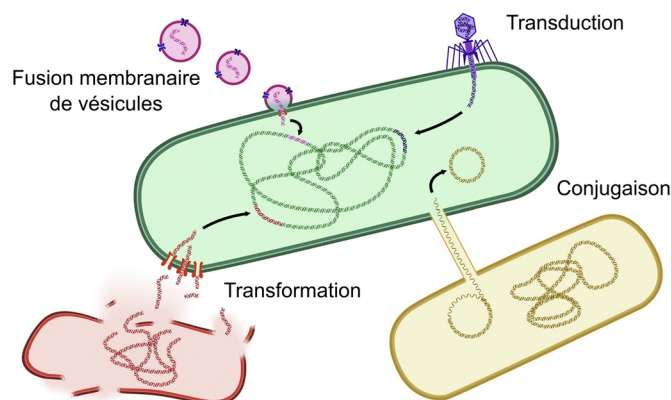


Figure 9 : Mécanismes de transfert horizontal de gènes adapté de [McInnes et al. \(2020\)](#).

Le transfert horizontal de gènes contribue à la grande diversité de plasmides retrouvée chez les *Vibrio* ([Boucher et Stokes, 2006](#)), à la présence de prophages intégrés dans le génome bactérien ou de bactériophages impliqués dans la virulence ([Waldor et Mekalanos, 1996](#)), ainsi qu'à la présence d'îlots de pathogénicité ([Karaolis et al., 1998](#), [Hacker et Kaper, 1999](#)). L'intégration de gènes exogènes *via* transfert horizontal est favorisée par la présence d'intégrons ([Boucher et Stokes, 2006](#)). En effet, les intégrons sont des structures génétiques capables d'incorporer et d'exprimer des séquences de gènes mobiles, dépourvues de séquences promotrices, appelées cassettes. Ils confèrent au génome une certaine plasticité génétique inculquant aux bactéries une capacité d'adaptation ([Escudero et al., 2018](#)). Ils sont ainsi souvent impliqués dans le phénomène de résistance aux antibiotiques ([Rowe-Magnus et al., 2002](#)). Une particularité du génome de *Vibrio* est la présence de super-intégrons ([Mazel et al., 1998](#)). Ces derniers correspondent à des intégrons chromosomiques sédentaires pouvant contenir un grand nombre de cassettes, à différencier des intégrons mobiles ([Escudero et al., 2018](#)). Ces super-intégrons peuvent être assimilés à des réservoirs génétiques jouant un rôle dans l'adaptation des bactéries aux conditions environnementales ([Rowe-Magnus et al., 2002](#)).

2.1.3. Caractéristiques biologiques, habitat et dynamique

Les bactéries du genre *Vibrio* sont des bacilles Gram-négatif de forme droite ou incurvée (en virgule). Leur taille varie de 0,5 à 0,8 μm de diamètre sur 1,4 à 2,6 μm de longueur. Les *Vibrio*

sont majoritairement capables de synthétiser deux types de flagelles en fonction de l'environnement dans lequel ces bactéries évoluent. En milieu liquide, un flagelle polaire peut être synthétisé, conférant aux bactéries une motilité de type « swimming ». En milieu solide, plusieurs flagelles latéraux peuvent être synthétisés, conférant aux bactéries une motilité de type « swarming ». Les *Vibrio* sont des bactéries anaérobies facultatives disposant de métabolismes oxydatif et fermentatif. Elles sont généralement halophiles, mésophiles et chimio-organotrophes. La plupart sont oxydase, catalase et nitrate réductase positives (Farmer *et al.*, 2005).

Les bactéries du genre *Vibrio* sont des organismes ubiquitaires du milieu aquatique. Elles sont présentes dans les milieux marins, estuariens, d'eau douce ainsi que dans les infrastructures aquacoles. Plusieurs paramètres environnementaux peuvent avoir une influence sur leur diversité et leur abondance (Thompson *et al.*, 2004a). Ces paramètres peuvent être d'ordre biotique tels que la composition en éléments organiques, la présence de pigments (chlorophylle a), la prédation par des protozoaires et l'infection par des virus, ou l'abondance d'algues et d'animaux aquatiques. Ils peuvent également être d'ordre abiotique tels que la composition en éléments inorganiques, la température, la salinité, le pH, l'oxygène dissous... (Takemura *et al.*, 2014, Siboni *et al.*, 2016, Davis *et al.*, 2017, Kopprio *et al.*, 2017, Kauffman *et al.*, 2018). Parmi ceux-ci, la température et la salinité se distinguent comme étant les plus corrélées à l'abondance de *Vibrio*. Toutefois, les nombreuses interactions entre ces facteurs génèrent une complexité dans l'étude de l'écologie et de la dynamique spatiale et temporelle des *Vibrio* (Takemura *et al.*, 2014).

Ainsi, les variations des conditions environnementales rencontrées sur le globe permettent d'expliquer la répartition et la diversité des *Vibrio*. Ces derniers, sont rarement isolés en Antarctique alors qu'ils prolifèrent dans les zones tropicales (Bowman *et al.*, 1997, Asplund *et al.*, 2011). Dans les zones tempérées, une tendance liée à la saisonnalité se distingue. Lors de mois chauds estivaux, la quantité de *Vibrio* sera plus importante que lors des mois froids hivernaux (Heidelberg *et al.*, 2002, Oberbeckmann *et al.*, 2012). De plus, étant donné la forte corrélation entre l'abondance des *Vibrio* et la température environnementale, il a été suggéré que ces bactéries peuvent être considérées comme un baromètre du réchauffement climatique (Baker-

Austin *et al.*, 2017). L'abondance et la diversité des espèces du genre *Vibrio* sont également dépendantes de la colonne d'eau. De plus, la population retrouvée en haute mer ne sera pas la même que celle retrouvée en eau douce, dans les estuaires, ou près des côtes (Thompson *et Polz*, 2006). Dans la majorité des cas, cette dernière sera plus importante que la quantité retrouvée en haute mer (Yooseph *et al.*, 2010).

Les fluctuations environnementales peuvent entraîner la création d'un environnement hostile incompatible avec la prolifération bactérienne. Afin de survivre face à des conditions défavorables, les *Vibrio* sont capables d'accroître leur tolérance et d'adopter des stratégies d'adaptation telles que l'état viable non cultivable (VNC) ou la formation de biofilms (Orruño *et al.*, 2017).

2.2. La stratégie d'adaptation des *Vibrio*

2.2.1. L'état viable non cultivable (VNC)

L'état viable non cultivable (VNC) est un état physiologique bactérien, caractérisé par un métabolisme réduit et une perte temporaire du caractère cultivable. Il est généralement observé chez les bactéries soumises à un stress, résultant de conditions environnementales défavorables. Les facteurs ainsi que les temps d'exposition, pouvant induire l'état VNC chez les *Vibrio* sont nombreux et variables d'une espèce à l'autre. Les facteurs, les plus fréquemment décrits, sont une diminution de la température, une augmentation de la salinité, un pH extrême ou une exposition aux radiations solaires (Orruño *et al.*, 2017). Cet état est toutefois réversible. Un retour à des conditions environnementales plus favorables, telles qu'un apport de nutriments ou une augmentation de la température, permet aux bactéries de redevenir cultivables. Cette aptitude à « ressusciter » a longtemps été controversée. La question était de savoir si la reprise de la croissance était due à une reprise de l'activité métabolique des bactéries en état VNC ou simplement à une multiplication de quelques individus cultivables et non détectés au sein de la population VNC (Oliver, 2010). Aujourd'hui, plusieurs études confirment l'existence d'un mécanisme permettant aux *Vibrio* de « ressusciter » (Wong *et al.*, 2004, Du *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2017). Cependant celui-ci est encore mal compris (Zhang *et al.*, 2018).

Le problème majeur que représentent les *Vibrio* en état VNC repose sur leur capacité à être plus résistants aux antibiotiques et à conserver leur caractère pathogène (Baffone *et al.*, 2003, Ayrapetyan *et al.*, 2015). Ainsi, les bactéries en état VNC sont plus résistantes aux antibiotiques que les bactéries cultivables. Suite au retour des conditions environnementales favorables, ces bactéries peuvent à nouveau se multiplier et, dans le cas des souches pathogènes, infecter un hôte (Nowakowska *et al.*, 2013). En effet, bien que les bactéries en état VNC ne soient pas pathogènes, celles-ci peuvent retrouver leur capacité à induire une maladie suite au retour à l'état cultivable (Sun *et al.*, 2008). Ce problème est d'autant plus préoccupant que les bactéries en état VNC ne sont pas détectables par les méthodes culturales généralement utilisées en industries agroalimentaires ou aquacoles. La présence de pathogènes en état VNC peut ainsi induire un risque pour le consommateur. Ces bactéries peuvent également être rencontrées au sein de biofilms (Koo *et al.*, 2017, Mougin *et al.*, 2019).

2.2.2. Les biofilms bactériens

Un biofilm bactérien est une communauté bactérienne complexe, hétérogène et dynamique, rendue unique par la diversité des espèces qui la compose. C'est un agrégat bactérien, s'accumulant généralement au niveau d'une interface solide-liquide, incorporé dans une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS). Cette matrice est un conglomérat de biopolymères composé de polysaccharides, protéines, acides nucléiques et lipides, produits par les bactéries elles-mêmes. Elle représente plus de 90 % du biofilm et assure un rôle d'adhésion, de cohésion et de protection (Flemming *et al.*, 2010). La survie en biofilm est le mode de vie bactérien le plus répandu dans l'environnement. Il apporte un avantage écologique par rapport aux bactéries planctoniques notamment en facilitant les interactions dynamiques et synergiques telles que la communication intercellulaire ou le transfert horizontal de gènes. Ces interactions garantissent la restructuration et le renouvellement constant du biofilm en réponse aux fluctuations environnementales. La formation en biofilm est donc considérée comme une stratégie adaptative ainsi qu'une stratégie de colonisation (Flemming *et al.*, 2016).

La formation d'un biofilm en milieu liquide s'initie sur une surface biotique ou abiotique préalablement conditionnée. Lors de l'immersion d'une surface, ses propriétés physico-chimiques sont modifiées par adsorption de molécules organiques et inorganiques présentes dans le milieu. Il en résulte la création d'un film conditionnant, riche en nutriments. Les bactéries planctoniques sont alors attirées par chimiotactisme, et se déplacent vers cette surface grâce à leur flagelle. Ces bactéries, ainsi que celles physiquement transportées sur le support, peuvent alors initier la formation d'un biofilm (Stoodley *et al.*, 2002, Garrett *et al.*, 2008). Celle-ci se décompose en 4 étapes, l'adhésion, la prolifération, la maturation et la dispersion (Fig. 10) (Koo *et al.*, 2017) :

- **La phase d'adhésion** débute par un attachement réversible des bactéries au support par le biais d'interactions physico-chimiques telles que les forces de Van der Waals, les interactions électrostatiques, hydrophobes/hydrophiles, osmotiques etc. Il s'ensuit une phase d'attachement irréversible, au cours de laquelle les bactéries sont immobilisées suite à l'interaction des appendices protéiques (flagelle, pili, fimbriae) avec le support.
- **La phase de prolifération** se caractérise par le début d'une multiplication bactérienne et la formation de micro-colonies. La production d'appendices protéiques est réprimée et l'excrétion d'EPS est initiée.
- **La phase de maturation** du biofilm se caractérise par le développement tridimensionnel de la matrice d'EPS. Celle-ci devient une architecture complexe et hétérogène, incluant des structures en canaux et pores, facilitant la distribution en nutriments et la communication intercellulaire.
- **La phase de dispersion** se caractérise par la déstructuration du biofilm et par une libération des bactéries dans l'environnement. Lors de cette étape, la production d'EPS est réduite et la matrice est détruite grâce à la production d'enzymes. Les bactéries disséminées peuvent alors coloniser d'autres surfaces.

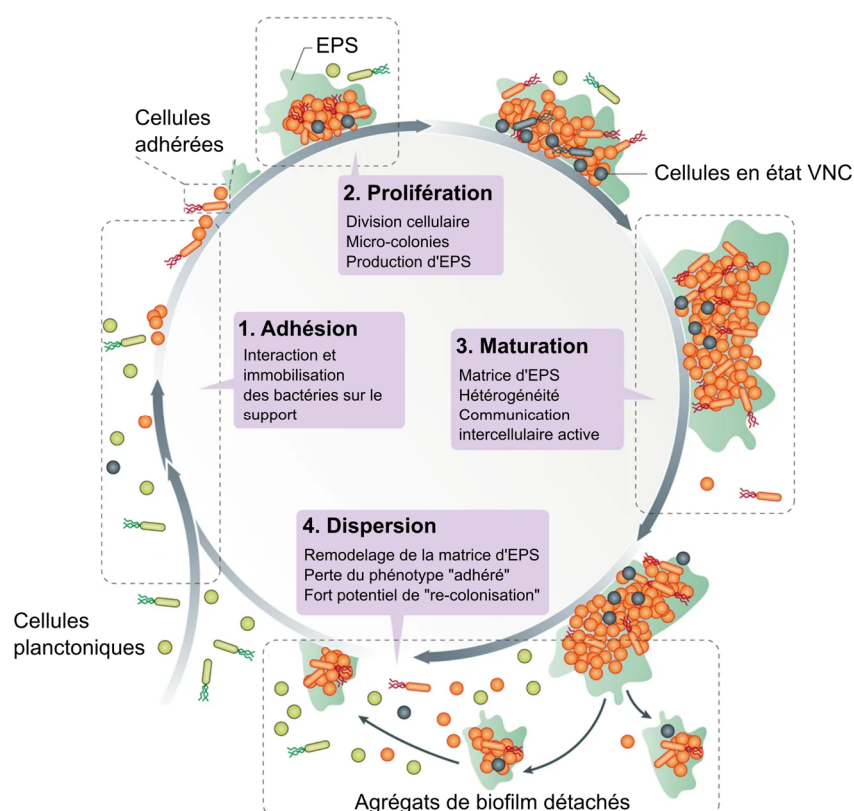


Figure 10 : Etapes de la formation d'un biofilm, adapté de [Koo et al. \(2017\)](#).

La formation d'un biofilm est étroitement liée au phénomène de quorum sensing (QS). Le QS est un mécanisme de communication intercellulaire qui permet de réguler l'expression de gènes en réponse à la fluctuation de la densité de la population. Ce mécanisme s'appuie sur la production et la perception de molécules solubles appelées auto-inducteurs (AIs). La concentration des AIs dans le milieu extracellulaire augmente avec la densité bactérienne. Lorsque cette concentration atteint un seuil « quorum », la liaison des AIs avec leurs récepteurs membranaires spécifiques entraîne une cascade de mécanismes aboutissant à la régulation de l'expression des gènes ([Wang et al., 2020](#)). Par exemple, chez *V. cholerae*, il a été démontré que les gènes régulés par les mécanismes de QS sont, entre autres, impliqués dans la synthèse des EPS ([Hammer et Bassler, 2003](#)). Chez *V. harveyi*, un lien a été mis en évidence entre la motilité flagellaire et le QS ([Yang et Defoirdt, 2015](#)). Certains mécanismes de QS sont intra-spécifiques alors que d'autres sont à la fois intra- et inter-spécifiques. Bien que les bactéries du genre *Vibrio* partagent des AIs communs

et un système de signalisation similaire, les mécanismes de régulation et de formation de biofilms sont propres à chaque espèce (Yildiz et Visick, 2009). Dans la littérature, les mécanismes de QS les plus décrits sont ceux des principales espèces pathogènes pour l'homme *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*. Les souches de *Vibrio fischeri* et *V. harveyi* bioluminescentes sont aussi particulièrement étudiées, en raison de l'implication du QS dans le phénomène de bioluminescence.

En milieu aquacole, le problème majeur que représente la formation de biofilms repose sur le fait que les bactéries incluses dans un biofilm sont plus résistantes aux antibiotiques et aux désinfectants que les bactéries planctoniques (Fig. 11) (Hall et Mah, 2017).

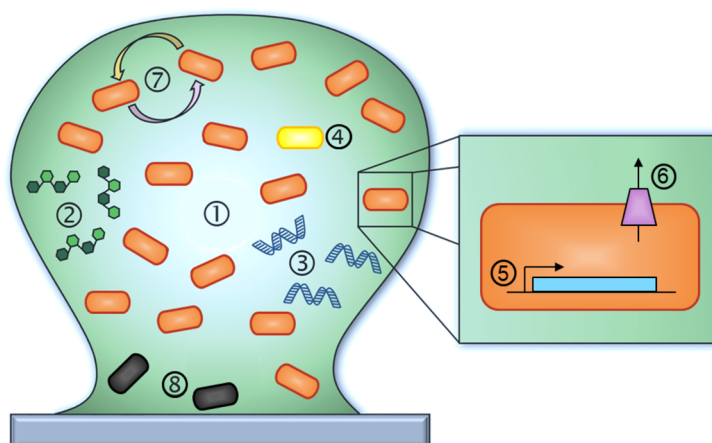


Figure 11 : Schéma représentant les principaux mécanismes de tolérance et résistance aux antibactériens au sein d'un biofilm. Les bactéries (rectangle orange) sont incorporées dans la matrice (vert), fixées à un support (gris). Les mécanismes de résistance sont liés aux facteurs suivants : 1. Gradient de nutriments, avec moins de nutriments disponibles au centre du biofilm, générant une réduction du métabolisme bactérien et donc une diminution de la sensibilité aux antibactériens; 2. Matrice d'exopolysaccharides, limitant la diffusion de substances antibactériennes; 3. ADN extracellulaire, altérant l'environnement extracellulaire et impliqué dans le transfert horizontal de gènes; 4. Réponses au stress (stress oxydatif, réponse stringente); 5. Expression de gènes spécifiques au biofilm, dont les produits de gènes sont impliqués dans la réduction de la sensibilité aux antibactériens; 6. Pompe d'efflux, éliminant les antibactériens vers le milieu extracellulaire; 7. Interactions intercellulaires: quorum sensing, transfert horizontal de gènes... favorisant l'adaptation des bactéries; 8. Cellules en état VNC, moins sensibles aux antibactériens. Adapté de Hall et Mah (2017).

Ainsi, les biofilms peuvent devenir une source de contamination récurrente et constituent des réservoirs pour des souches potentiellement pathogènes (Karunasagar *et al.*, 1996, Bourne *et al.*, 2006).

2.3. Les interactions hôte – *Vibrio*

2.3.1. Les relations symbiotiques

Certaines espèces de *Vibrio* peuvent entretenir des relations symbiotiques avec un hôte. Par exemple, l'espèce bioluminescente *Vibrio fischeri* entretient une relation symbiotique avec le calamar géant d'Hawaï (*Euprymna scolopes*). Les bactéries sont stockées dans l'organe lumineux du calamar, engendrant une luminescence visible de cet organe. Cette association représente pour le calamar, entre autres, une stratégie d'antiprédation. En effet, lors d'une chasse nocturne, le calamar régule l'intensité lumineuse émise, afin de correspondre à l'intensité lumineuse du clair de lune. Ceci permet d'empêcher la formation d'une tache noire sur le fond marin, pouvant signaler la position du calamar à ses prédateurs (Visick et McFall-Ngai, 2000). D'autre part, certaines espèces peuvent faire partie de la flore entérique de certains hôtes. C'est le cas pour *Vibrio haliotocoli*, qui représente 40 à 65 % de la flore bactérienne intestinale des ormeaux. Cette association permet la transformation d'alginate, composé majeur des algues brunes consommées par les ormeaux, en acide acétique, importante source d'énergie. En contrepartie, la bactérie dispose d'un habitat propice à sa croissance (Sawabe *et al.*, 2003).

2.3.2. Les principales espèces pathogènes pour l'Homme

Les espèces majoritairement pathogènes pour l'Homme, sont constituées de *Vibrio* cholériques : *Vibrio cholerae*, plus communément sérotypes O1 et O139 responsables du choléra et de *Vibrio* non cholériques : *Vibrio cholerae* non-O1 et non-O139, *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio vulnificus*.

Les *Vibrio* cholériques

Le choléra est une infection bactérienne causée par certaines souches appartenant à l'espèce *V. cholerae*. L'infection chez l'Homme résulte de l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés, renfermant une forte concentration de l'agent pathogène. Cette maladie est caractérisée par une diarrhée aiguë, entraînant une déshydratation intense qui peut provoquer le décès en seulement quelques heures (Prouty et Klose, 2006). Depuis 1817, *V. cholerae* a été mis en cause dans 7 pandémies à travers le monde, et il semble aujourd'hui à

l'origine d'une 8^{ème} pandémie, toujours en cours en Inde et en Asie. Les 6 premières pandémies ont été associées au sérotype O1, biotype dit « Classique », alors que la 7^{ème} a été associée au sérotype O1, biotype dit « El Tor » (Barua, 1992). La 8^{ème} pandémie, datant de 1992, est quant à elle, associée au sérotype O139 (Bhattacharya *et al.*, 1993, Ramamurthy, 1993).

Les *Vibrio* non cholériques Des souches de *V. cholerae* non-O1 et non-O139 ont également été reportées dans des cas sporadiques de diarrhée aiguë chez l'Homme mais n'ont pas été mises en cause dans l'émergence de pandémies (Haley *et al.*, 2014).

L'infection par *V. parahaemolyticus*, chez l'Homme est caractérisée par une gastroentérite, associée à la consommation de produits de la mer principalement crus ou séchés. La première épidémie confirmée est apparue au Japon en 1950, suite à une consommation de sardines juvéniles séchées. Au cours de celle-ci, 272 malades dont 20 morts ont été recensés (Fujino *et al.*, 1953). Elle a ensuite été détectée dans divers pays du globe, en particulier la France (Nair *et al.*, 2007). Depuis, cette espèce est fortement surveillée et contrôlée dans les produits de la mer.

Vibrio vulnificus est considérée comme l'espèce pathogène la plus virulente pour l'Homme avec un taux de mortalité de plus de 50 %, suite à la consommation de produits de la mer contaminés, plus spécifiquement des huîtres. Cette espèce est également responsable d'infections de plaies exposées à l'eau de mer, pouvant engendrer des septicémies importantes (Oliver, 2005).

Ces espèces représentent une menace pour la santé publique et sont donc très largement étudiées dans la littérature. D'autres espèces du genre *Vibrio* représentent un risque pour la santé animale.

2.3.3. Les espèces pathogènes recensées en milieu aquacole

De nombreuses espèces de *Vibrio* peuvent être pathogènes pour les crustacés, mollusques et poissons. Le Tableau 2 permet de recenser les différentes espèces pathogènes.

Tableau 2 : Liste d'espèces de *Vibrio* pouvant causer des maladies en milieu aquacole.

Principales espèces pathogènes	Hôtes sensibles	Symptômes	Références
Crustacés			
<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	Mortalité, anorexie	(Liu <i>et al.</i> , 2004a)
<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Jasus verreauxi</i>	Luminous vibriosis	(Diggles <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Penaeus monodon</i>		(Ruangpan, 1998)
<i>Vibrio nigripulchritudo</i>	<i>Litopenaeus stylirostris</i>	Summer syndrome	(Goarant <i>et al.</i> , 2006)
<i>Vibrio owensii</i>	<i>Penaeus monodon</i>	-	(Cano-Gomez <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Panulirus ornatus</i>		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Penaeus monodon</i>	Bright-red syndrome	(Alapide-Tendencia et Dureza, 1997)
<i>Vibrio penaeicida</i>	<i>Litopenaeus stylirostris</i>	Syndrome 93	(Goarant <i>et al.</i> , 1998)
Mollusques			
<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Haliotis rufescens</i>	Mortalité	(Anguiano-Beltran <i>et al.</i> , 1998)
<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Haliotis tuberculata</i>	Taches blanches sur le pied, perte d'adhérence	(Nicolas <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Haliotis [=Sulculus] diversicolor supratexta</i>		(Travers <i>et al.</i> , 2010)
			(Nishimori <i>et al.</i> , 1998)
<i>Vibrio splendidus</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	Nécroses	(Sugumar <i>et al.</i> , 1998)
<i>Vibrio tapetis</i>	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Maladie de l'anneau brun, mortalité	(Allam <i>et al.</i> , 2002)
			(Paillard <i>et al.</i> , 2008)
<i>Vibrio tubiashii</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	Mortalité	(Elston <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Crassostrea sikamea</i>		
	<i>Panope abrupta</i>		
Poissons			
<i>Vibrio anguillarum</i>	<i>Salmo salar</i>	Septicémie hémorragique,	(Frans <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	exophtalmie, ulcères,	(Korun et Timur, 2008)
	<i>Psetta maxima</i>	léthargie, perte de poids	
	<i>Dicentrarchus labrax</i>		
	<i>Sparus aurata</i>		
	<i>Plecoglossus altivelis</i>		
<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Septicémie hémorragique	(Korun et Timur, 2008)
<i>Vibrio ordalii</i>	<i>Salmo salar</i>	Septicémie hémorragique	(Colquhoun <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Oncorhynchus keta</i>		(Ransom <i>et al.</i> , 1984)
	<i>Dicentrarchus labrax</i>		(Korun et Timur, 2008)
<i>Vibrio salmonicida</i>	<i>Gadus morhua</i>	Cold-water vibriosis	(Sørum <i>et al.</i> , 1990)
	<i>Salmo salar</i>		

D'après ce tableau, l'espèce *V. harveyi* a été reconnue pathogène, à la fois chez les crustacés, les mollusques et les poissons. Cette espèce constitue ainsi une préoccupation majeure pour différents secteurs aquacoles. De plus selon Vendramin *et al.* (2016), l'espèce *V. harveyi* est devenue un problème émergent pour l'aquaculture du bar commun

3. L'espèce *Vibrio harveyi*

3.1. Historique et taxonomie

L'espèce *Vibrio harveyi* (Fig. 12) a été décrite pour la première fois chez un amphipode mort du genre *Talorchestia* au Massachusetts en 1935. Originellement, elle a été nommée *Achromobacter harveyi* en l'honneur de E. N. Harvey pionnier dans le phénomène de bioluminescence (Johnson et Shunk, 1936). En effet, cette bactérie possède la particularité d'être bioluminescente. Elle est d'ailleurs associée au phénomène de marée bioluminescente ou *milky sea* correspondant à une diffusion de bioluminescence, visible à la surface de l'océan, associée à la prolifération de micro-algues (Miller *et al.*, 2005).

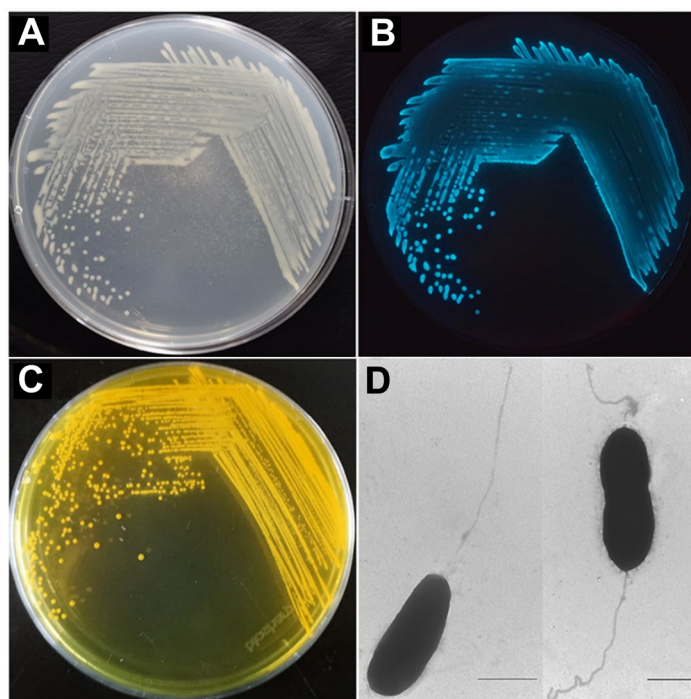


Figure 12 : Photographies indiquant la morphologie des souches de *Vibrio harveyi*. A. Croissance de la souche VIB 391 sur marine agar 2216E ; B. Luminescence de la souche VIB 391 ; C. Croissance de la souche VIB 645 sur TCBS ; D. Microscopie électronique en transmission de la souche VIB 645 cultivée en marine broth, échelle = 1 μm (Zhang *et al.*, 2020).

Par la suite, elle a été identifiée en tant que *Lucibacterium harveyi* puis *Beneckea harveyi* pour finalement être assignée au genre *Vibrio* et nommée *Vibrio harveyi* (Baumann *et al.*, 1980). Plus tard, grâce au développement des méthodes d'identification, en particulier AFLP, ribotypage et hybridation ADN-ADN, *Vibrio carchariae* et *Vibrio trachuri* ont été reconnues comme synonymes de *V. harveyi* (Pedersen *et al.*, 1998, Thompson *et al.*, 2002).

L'espèce *V. harveyi* fait partie du clade Harveyi (Fig. 8, section 2.1.1, p.24). Bien qu'il n'existe pas de consensus établi concernant les critères d'appartenance d'une espèce au clade Harveyi, il est admis que ce dernier comprend 11 espèces : *V. alginolyticus*, *Vibrio azureus*, *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. jasicida*, *Vibrio mytili*, *V. natriegens*, *V. owensii* (synonyme de *V. communis*) *V. parahaemolyticus*, *V. rotiferianus* et *Vibrio sagamiensis* (Sawabe *et al.*, 2013, Urbanczyk *et al.*, 2013a).

3.2. Maladies associées à l'espèce *Vibrio harveyi*

3.2.1. Les espèces sensibles

L'espèce *V. harveyi* s'est avérée pathogène pour de nombreux organismes marins vertébrés et invertébrés en milieu sauvage et aquacole (Austin et Zhang, 2006). Cette espèce est principalement reconnue pathogène pour les crustacés, mollusques et poissons. Néanmoins, de rares cas d'infection à *V. harveyi* chez l'Homme, ont été recensés suite au contact d'une plaie avec de l'eau contaminée ou suite à une morsure de requin (Pavia *et al.*, 1989, Del Gigia-Aguirre *et al.*, 2017, Brehm *et al.*, 2020). Les symptômes dépendent fortement de l'espèce atteinte, l'âge et la sensibilité. Le Tableau 3, non exhaustif, donne une vue d'ensemble des espèces sensibles à *Vibrio harveyi* en milieu aquacole.

Tableau 3 : Liste non exhaustive des espèces répertoriées sensibles à *Vibrio harveyi* en milieu aquacole.

Nom scientifique	Nom vernaculaire	Classe d'âge	Signes cliniques	Mortalité	Localisation	Référence
Crustacés						
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	Crevette charnue	Larve, juvénile	Inactivité, anorexie, perte des setae, opacité des larves	Oui	Chine	(Vandenberghe <i>et al.</i> , 1998)
<i>Jasus verreauxi</i>	Homard	Larve	<i>Luminous vibriosis</i>	Oui	Nouvelle Zélande	(Diggles <i>et al.</i> , 2000)
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	Crevette kuruma	-	-	Oui	Taiwan	(Liu <i>et al.</i> , 1996a)
<i>Penaeus monodon</i>	Crevette géante tigrée	Larve, juvénile	<i>Luminous vibriosis</i> ou <i>Tea Brown Gill Syndrome</i>	Oui	Australie Thaïlande	(Pizzutto et Hirst, 1995, Ruangpan, 1998)
<i>Penaeus vannamei</i>	Crevette à pattes blanches	Larve, juvénile	<i>Bright-red syndrome</i>	Oui	Mexique	(Soto-Rodriguez <i>et al.</i> , 2010)
<i>Portunus trituberculatus</i>	Crabe bleu japonais	Larve, juvénile	-	Oui	Chine	(Zhang <i>et al.</i> , 2014)
Mollusques						
<i>Haliotis</i> [= <i>Sulculus</i>] <i>diversicolor supratexta</i>	Ormeau du Nord du Japon	-	Taches blanches sur le pied, perte d'adhérence	Oui	-	(Nishimori <i>et al.</i> , 1998)
<i>Haliotis rubra</i> , <i>H. laevigata</i> et leurs hybrides	Haliotope à ventre noir, Ormeau australien lisse	Juvénile	-	-	Australie	(Handlering <i>et al.</i> , 2005)
<i>Haliotis tuberculata</i>	Ormeau européen	Adulte	-	Oui	France	(Nicolas <i>et al.</i> , 2002) (Travers <i>et al.</i> , 2010)
<i>Pinctada maxima</i>	Huitre perlière	-	-	Oui	Australie	(Pass <i>et al.</i> , 1987)
Echinoderme						
<i>Holothuria scabra</i>	Concombre de mer	Juvénile	Ulcères cutanés	Oui	Madagascar	(Becker <i>et al.</i> , 2004)
Poissons						
<i>Acanthopagrus latus</i>	Pagre à nageoires jaunes	-	Gastroentérite	Oui	Taiwan	(Lee <i>et al.</i> , 2002)
<i>Acanthopagrus schlegeli</i>	Pagre tête noire	-	Gastroentérite	Oui	Taiwan	(Lee <i>et al.</i> , 2002)
<i>Acanthurus sohal</i>						
<i>Centropomus undecimalis</i>	Brochet de mer	Adulte	Maladie oculaire : opacité de la cornée	-	Etats-Unis	(Kraxberger-Beatty <i>et al.</i> , 1990)
<i>Dentex dentex</i>	Denté commun	Juvénile	-	Oui	Espagne	(Company <i>et al.</i> , 1999)
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Bar commun	Juvénile	Léthargie, exophthalmie, ulcères et lésions cutanés, hémorragies des organes internes, ascite, pâleur du rein et du foie	Oui	Turquie	(Korun et Timur, 2008)

Nom scientifique	Nom vernaculaire	Classe d'âge	Signes cliniques	Mortalité	Localisation	Référence
<i>Dicologlossa cuneata</i>	Céteau	Alevin, juvénile, adulte	Ulcères	Oui	Espagne	(López <i>et al.</i> , 2009)
<i>Epinephelus awoara</i>	Mérou jaune	-	Ulcères	Oui	Chine	(Austin et Zhang, 2006)
<i>Epinephelus coioides</i>	Mérou à tâches oranges	-	Ulcères cutanés Gastroentérite	Oui	Chine Taiwan	(Yi <i>et al.</i> , 1997, Chen <i>et al.</i> , 2004)
<i>Epinephelus fuscoguttatus</i> (♀) × <i>E. lanceolatus</i> (♂)	Hybride mérou marbré × mérou géant	Juvénile	Ulcères cutanés	Oui	Taiwan	(Shen <i>et al.</i> , 2017)
<i>Epinephelus tauvina</i>	Mérou loutre	-	-	Oui	Koweït	(Saeed, 1995)
<i>Lateolabrax japonicus</i>	Bar du Japon	-	Gastroentérite	Oui	Taiwan	(Lee <i>et al.</i> , 2002)
<i>Lates calcarifer</i>	Barramundi	Adulte	Maladie oculaire : hémorragie, opacité de la cornée, exophtalmie	Oui		(Tendencia, 2002)
<i>Mola mola</i>	Poisson-lune		Infection oculaire opportuniste	-	Espagne	(Hispano <i>et al.</i> , 1997)
<i>Pagrus auratus</i>	Daurade argentée	Juvénile, adulte	Gonflement de la vessie natatoire et des intestins (co-infection avec <i>Photobacterium damsela</i>)	Oui	Australie	(Stephens <i>et al.</i> , 2006)
<i>Paralichthys dentatus</i>	Plie	Juvénile	Entérite nécrotique	Oui	Etats-Unis	(Soffientino <i>et al.</i> , 1999)
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Cardeau hirame	Adulte	Ascite	Oui	Corée	(Oh <i>et al.</i> , 2006)
<i>Rachycentron canadum</i>	Cobia	Juvénile	Gastroentérite et ascite	Oui	Taiwan	(Liu <i>et al.</i> , 2004b)
<i>Sciaenops ocellatus</i>	Tambour rouge	-	Gastroentérite	Oui	Taiwan	(Liu <i>et al.</i> , 2003)
<i>Scophthalmus maximus</i>	Turbot	-	Ulcères, hémorragie, mélanose	Oui	Chine	(Fan <i>et al.</i> , 2005, Sun <i>et al.</i> , 2007)
<i>Seriola dumerili</i>	Sériole	-	Ascite, maladie oculaire	Oui	Japon	(Minami <i>et al.</i> , 2016)
<i>Solea senegalensis</i>	Sole du Sénégal	-	Ulcères cutanés et hémorragie près de la bouche et des nageoires	Oui	Espagne	(Zorrilla <i>et al.</i> , 2003)
<i>Sparidentex hasta</i> (<i>Acanthopagrus cuvieri</i>)	Spare sobaity	-	Ulcères cutanés, gastroentérite	Oui	Koweït	(Saeed, 1995)
<i>Sparus aurata</i>	Daurade royale	Larve, juvénile	Maladie oculaire, érosion de la queue, sécrétion de mucus	Oui	Malte	(Haldar <i>et al.</i> , 2010b)
<i>Squalus acanthias</i>						
<i>Takifugu rubripes</i>	-	Juvénile	-	Oui	Japon	(Mohi <i>et al.</i> , 2010)
<i>Trachinotus blochii</i>	Pompaneau lune	-	Exophtalmie, infection opportuniste	-	Philippine	(Pakingking Jr <i>et al.</i> , 2018)
<i>Trachurus japonicus</i>	Chinchard du Japon	-	Hémorragie interne, exophtalmie	Oui	Japon	(Iwamoto <i>et al.</i> , 1995)

3.2.2. Les signes cliniques chez le bar commun

Concernant le bar commun, des épisodes de vibriose causés par *V. harveyi* ont été principalement recensés dans les pays méditerranéens, tels que l'Espagne (Pujalte *et al.*, 2003), la Turquie (Korun et Timur, 2008, Uzun et Ogut, 2015) et la France (Le Breton, 1999). Le Breton (1999) a signalé la présence d'infections à *V. harveyi* chez des individus juvéniles et adultes, dont les principaux symptômes étaient des ulcères. Korun et Timur (2008) ont signalé un épisode touchant des individus juvéniles et engendrant une mortalité journalière entre 9 et 12 %. Les principaux symptômes décrits étaient une léthargie, une exophtalmie, des ulcères et lésions cutanées, des hémorragies des organes internes, une ascite ou une pâleur du rein et du foie. Selon Uzun et Ogut (2015), certains individus pourraient également être atteints de mélanose. Quelques-uns de ces symptômes sont représentés dans la Figure 13.



Figure 13 : Lésions anatomopathologiques chez le bar commun (*Dicentrarchus labrax*) résultant d'une infection volontaire à *V. harveyi* par immersion. A. Individus atteints de mélanose (flèche) comparés à des individus non atteints (tête de flèche). B. Ulcères cutanés et érosion de la nageoire caudale (flèche) avec exophtalmie (tête de flèche). C. Dilatation de l'intestin, entérite. Selon Pretto (2018).

3.3. Pathogénie et virulence

Initialement, un agent pathogène était défini comme un agent microbien pouvant causer une maladie. Cette approche suggérait qu'il existait des agents pathogènes et des agents non pathogènes. Toutefois, cette définition s'est révélée trop restrictive puisque certains agents microbiens, apparemment non pathogènes ou commensaux, étaient capables d'induire une maladie chez un hôte immunodéprimé. C'est ainsi qu'est apparu le terme d'agent pathogène dit « classique » ou « obligatoire » et d'agent pathogène dit « opportuniste » (Casadevall et Pirofski,

1999). La définition d'un agent pathogène doit donc prendre en compte ces différentes terminologies. C'est ainsi que Casadevall et Pirofski (2009) et Casadevall et Pirofski (1999) définirent l'agent pathogène comme un agent microbien capable de causer des dommages chez un hôte sensible. Sa pathogénie représente sa capacité à causer des dommages chez un hôte sensible, alors que sa virulence représente sa capacité relative (en terme d'intensité) à causer des dommages chez un hôte sensible. Enfin, un facteur de virulence est un élément microbien capable de causer des dommages chez un hôte sensible.

De manière générale, le cycle infectieux d'un agent pathogène peut démarrer avec l'entrée en contact d'un hôte et son internalisation. L'eau étant le mode de transmission majeur des *Vibrio*, l'invasion peut survenir principalement *via* le tube digestif, les branchies ou la peau. La bactérie va ensuite s'installer et se multiplier en causant des dommages modérés ou sévères pour les tissus de l'hôte. Enfin, la bactérie sera libérée dans l'environnement et pourra de nouveau infecter un autre hôte. Chaque étape de l'infection est associée avec divers facteurs de virulence, détaillés dans cette partie (Austin et Zhang, 2006, Defoirdt, 2014, Vanmaele *et al.*, 2015).

Chez *V. harveyi*, ces facteurs sont généralement acquis *via* des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, phages et transposons (Pizzutto et Hirst, 1995, Austin et Zhang, 2006). Ainsi, il est important de noter que *V. harveyi* est une espèce très diversifiée dont le mécanisme de pathogénie est encore mal connu. Celui-ci divergerait en fonction de l'hôte infecté, notamment entre les poissons et les invertébrés (Zhang *et al.*, 2020).

3.3.1. Infection et colonisation d'un hôte

L'activité **flagellaire** couplée au mécanisme de **chimiotactisme** confère aux bactéries une motilité essentielle à l'association et la colonisation d'un hôte. Le chimiotactisme s'inscrit dans un mécanisme de signalisation complexe qui génère un mouvement bactérien en modulant la vitesse et la rotation des flagelles en réponse à des stimuli environnementaux (Wadhams et Armitage, 2004). Grâce à ce mécanisme, les flagelles permettent aux bactéries de se déplacer vers un tissu cible d'un hôte. Par exemple, les bactéries sont particulièrement attirées par le mucus

présent à la surface de la peau et des branchies ou sur la paroi intestinale, en raison de sa forte teneur en nutriments (Bordas *et al.*, 1998). Ainsi, le flagelle polaire permettra à la bactérie de se déplacer dans l'environnement vers l'hôte et les flagelles latéraux permettront un déplacement au sein des tissus de l'hôte. Une fois l'hôte atteint, les flagelles jouent un rôle dans l'adhésion initiale des bactéries en annihilant la répulsion générée par les forces électrostatiques négatives (McCarter, 2001). Par exemple, il a été démontré que la perte de motilité chez *V. harveyi* réduit fortement son potentiel pathogène (Yang et Defoirdt, 2015).

Les **pili** confèrent également aux bactéries une capacité d'adhésion essentielle à la colonisation (Yildiz et Visick, 2009). Les pili ou fimbriae sont des appendices protéiques membranaires filamenteux qui possèdent à leur extrémité des molécules de type adhésines capables de se lier à différents tissus (Proft et Baker, 2009). Par exemple, chez *V. harveyi*, certaines protéines sont capables de se lier spécifiquement à la chitine (Montgomery et Kirchman, 1994). Bien que leur rôle n'ait pas encore été bien identifié, elles sont présumées impliquées dans l'adhésion et la dégradation des surfaces chitineuses telles que l'exosquelette des organismes marins, impliquant également les chitinases (Yildiz et Visick, 2009).

La production de **substances polymériques extracellulaires (EPS)** et la formation de **biofilm** sont également impliquées dans la colonisation (Karunasagar *et al.*, 1996, Yildiz et Visick, 2009). Parmi ces EPS, la sécrétion d'exopolysaccharides génère la production d'une couche visqueuse particulièrement impliquée dans la formation de la matrice des biofilms. Cette matrice confère adhésion, cohésion et protection aux bactéries (Ruwandeeepika *et al.*, 2010). En aquaculture, la présence de biofilms de *V. harveyi* est considérée comme un réservoir de souches potentiellement pathogènes (Karunasagar *et al.*, 1996). Il a été démontré que les biofilms de *V. harveyi* étaient particulièrement résistants aux désinfectants et aux antibiotiques, induisant une persistance en milieu aquacole (Karunasagar *et al.*, 1994).

3.3.2. Multiplication et dommages tissulaires

La virulence des bactéries est notamment associée à la sécrétion d'**enzymes lytiques**. Ces dernières provoquent des dommages chez l'hôte, et permettent aux bactéries de se propager au sein des tissus et d'obtenir des nutriments essentiels à la croissance et la multiplication. Plusieurs types d'enzymes lytiques ont été identifiés chez *V. harveyi* : des hémolysines, des protéases, des lipases et des chitinases.

Les **hémolysines** sont des exotoxines capables de provoquer la lyse des cellules sanguines, comme les érythrocytes, en s'attaquant à la membrane cellulaire. Le rôle des hémolysines dans la virulence des souches de *V. harveyi* a été décelé à la fois chez les crevettes et chez les poissons (Liu *et al.*, 1996b, Sun *et al.*, 2007). Plus particulièrement, une hémolysine thermolabile (TLH) nommée *Vibrio harveyi* hémolysine (VHH) et codée par le gène *vhh*, a été mise en évidence chez *V. harveyi* (Zhang *et al.*, 2001). Notamment, Zhang *et al.* (2001) ont démontré la présence de 2 copies du gène *vhh* chez une souche de *V. harveyi* (VIB 645) hautement pathogène pour les salmonidés. La lyse des érythrocytes provoque la libération de leur contenu en particulier l'hémoglobine, la transferrine et la lactoferrine. Ainsi, le fer lié à ces protéines est rendu accessible aux bactéries et sera ensuite capté par les **sidérophores** (Zhang et Austin, 2005).

Le fer est un élément essentiel, impliqué dans le métabolisme des bactéries. Lors de l'infection d'un hôte, la biodisponibilité du fer est limitée puisqu'en majorité elle est intracellulaire et liée à des protéines. Afin de pallier une déplétion du fer dans leur environnement, les bactéries produisent et sécrètent des sidérophores. Ces derniers sont des chélateurs de faible poids moléculaire ayant une forte affinité pour le fer. Ils permettent ainsi aux bactéries d'acquérir le fer séquestré par les protéines de l'hôte (Skaar, 2010). Les sidérophores sont considérés comme un facteur de virulence chez *V. harveyi* (Owens *et al.*, 1996, Soto-Rodriguez *et al.*, 2003). Won et Park (2008) ont mis en évidence une corrélation entre la production de sidérophores par *V. harveyi* et la mortalité de poissons, tels que le cardeau hirame (*Paralichthys olivaceus*) et le sébaste coréen (*Sebastes schlegelii*).

Les **protéases** jouent également un rôle prépondérant dans la virulence de *V. harveyi*. Ce sont des enzymes lytiques capables de digérer une variété de protéines chez l'hôte. Chez *V. harveyi*, 3 types de protéases impliquées dans la virulence ont été isolées et identifiées : une protéase à sérine, une métalloprotéase et une protéase à cystéine (Liu *et al.*, 1997, Teo *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2008). Il a été démontré que la protéase à cystéine peut avoir un effet létal chez les crevettes, *Penaeus monodon*, en interférant avec l'hémostase, grâce à la réduction du coagulogène, présent dans le plasma (Lee *et al.*, 1999). Les métalloprotéases peuvent engendrer des dommages tissulaires en dégradant certains composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène, la gélatine ou la fibronectine (Teo *et al.*, 2003). Ces protéases sont principalement produites lors de l'infection d'un hôte. En effet, Ruwandeepika *et al.* (2011) ont mis en évidence la présence d'un pic d'expression des gènes *srp* et *vhp* codant pour la protéase à sérine et la métalloprotéase respectivement chez des espèces du clade Harveyi, lors de l'infection d'un hôte.

Les **lipases** sont des enzymes qui transforment les chaînes longues de triglycérides en acides gras et molécules de glycérol. Ces protéines peuvent potentiellement causer des dommages au niveau des tissus de l'hôte. Bien qu'elles aient été isolées chez *V. harveyi*, leur implication dans la virulence n'a pas encore été mise en évidence (Teo *et al.*, 2003, Montánchez et Kaberdin, 2019). Toutefois, une corrélation entre la production par *V. harveyi* de phospholipases, ainsi que de protéases ou de sidérophores, et le taux de mortalité des nauplii (*Artemia franciscana*) infectés a été décelée (Soto-Rodriguez *et al.*, 2003).

Les **chitinases** sont des enzymes hydrolytiques capables de transformer les polymères de chitine en chitine-oligosaccharides, ensuite métabolisés en source d'azote et de carbone. L'excrétion de chitinases, permet une dégradation des surfaces protectrices chitineuses et entraîne une exposition des tissus aux agents pathogènes. Ces protéines jouent donc un rôle essentiel dans la colonisation des hôtes possédant un exosquelette chitineux (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2004). *V. harveyi* est capable de sécréter plus de 10 chitinases différentes. Certaines sont constamment produites alors que d'autres sont excrétées en présence de certaines formes de chitines (Svitol *et al.*, 1997).

Les **endotoxines**, c'est-à-dire des toxines situées sur la paroi des bactéries et libérées lors de la lyse bactérienne peuvent également jouer un rôle dans la virulence. Chez *V. harveyi*, la présence de lipopolysaccharides pouvant induire une pathogénie pour la langoustine commune (*Nephrops norvegicus*) a été mise en évidence. Selon [Montero et Austin \(1999\)](#), des extraits de produits extracellulaires de *V. harveyi*, traités et non traités à la protéinase K ou chauffés (100 °C, 10 min) entraînent une pathogénie. Ces résultats suggèrent l'existence d'une toxine non protéique et thermostable au sein des produits extracellulaires. Ces lipopolysaccharides mis en évidence ont été ainsi considérés comme une toxine létale de *V. harveyi*.

Les **bactériocines** sont des toxines protéiques produites par des bactéries, démontrant une toxicité pour les bactéries proches de la bactérie productrice. Leur spectre d'action est donc généralement étroit. La production de bactériocines représente un avantage compétitif pour la bactérie productrice en facilitant sa prolifération au sein d'une communauté bactérienne ([Riley et Wertz, 2002](#)). Une bactériocine nommée *bacteriocin-like substance* (BLIS) a été isolée chez une souche virulente de *V. harveyi*. Celle-ci pourrait ainsi induire une dominance de la souche virulente productrice par rapport aux souches sensibles. Ceci faciliterait l'accès aux ressources lors de la colonisation d'un hôte et assurerait la survie de la bactérie productrice ([Prasad et al., 2005](#)).

Systèmes de sécrétion de type III La plupart des facteurs de virulence sont soit localisés sur la membrane bactérienne, soit sécrétés. Les bactéries disposent donc de systèmes de sécrétion permettant le transport de facteurs de virulence jusqu'à la membrane ou leur libération dans le milieu extracellulaire. Ces systèmes jouent donc un rôle important dans la pathogénie des bactéries. Chez *V. harveyi*, un système de sécrétion de type III a été identifié et régulé par le système de quorum sensing ([Henke et Bassler, 2004a](#)).

3.3.3. Régulation de l'expression et transfert des facteurs de virulence

L'expression de gènes de virulence s'inscrit dans un mécanisme métaboliquement coûteux. Les facteurs de virulence ne sont pas toujours nécessaires à la survie des bactéries. Par exemple,

certaines facteurs seront particulièrement requis lors de l'infection d'un hôte mais pas indispensables lors de leur survie en phase planctonique. Leur production est donc sous le contrôle de divers systèmes de régulation tels que le quorum sensing (QS) ou le gène *toxR*. L'environnement et les caractéristiques de l'hôte jouent également un rôle prépondérant dans l'expression des facteurs de virulence (Ruwandeeepika *et al.*, 2010).

Quorum sensing Comme défini dans la section 2.2.2. (p.31), le QS permet de réguler l'expression de gènes en réponse à la fluctuation de la densité de la population *via* la production et la perception d'auto-inducteurs (AIs). Le QS de *V. harveyi* s'appuie sur 3 systèmes de signalisation impliquant différents AIs, fonctionnant en synergie (Fig. 14) (Papenfort et Bassler, 2016):

- Le système LuxM/N impliquant un acyl-homosérine lactone HAI-1 (*harveyi* auto-inducteurs) produit par la synthase LuxM et détecté par le récepteur LuxN. Ce système a été mis en évidence uniquement chez *V. harveyi*.
- Le système LuxS/PQ impliquant un furanosyl borate diester AI-2 (auto-inducteur 2) produit par la synthase LuxS et détecté par le récepteur LuxPQ (complexe à 2 domaines). LuxP est le domaine de liaison et LuxQ est un domaine périplasmique permettant l'activation du QS. Ce système a été mis en évidence chez de nombreuses bactéries et constitue ainsi un système de communication inter-espèces.
- Le système CqsA/S impliquant une (Z)-3-aminoundec-2-en-4-one CAI-1 (choléra autoinducteur 1) produite par la synthase CsqA et détectée par le récepteur CqsS. Ce système a été mis en évidence uniquement chez plusieurs espèces de *Vibrio*.

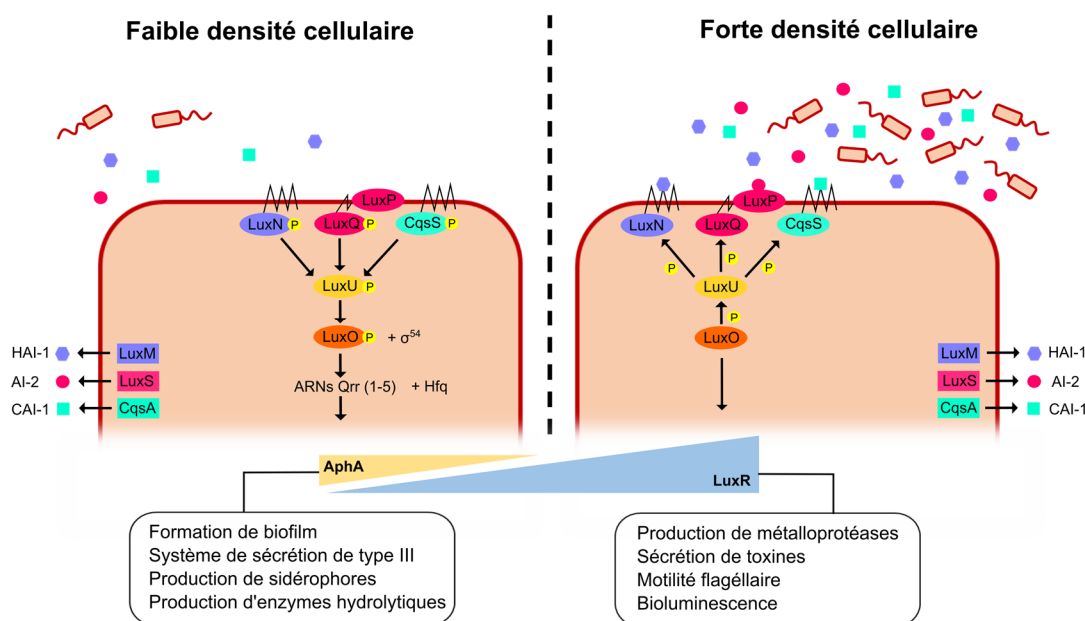


Figure 14 : Quorum sensing de *Vibrio harveyi* et les mécanismes de virulence associés, adapté de Montánchez et Kaberdin (2019).

À faible densité cellulaire, la concentration d'AIs dans le milieu extracellulaire est faible. Ainsi, les récepteurs LuxN, LuxQ et CqsS, fonctionnent alors comme des kinases. Ils s'auto-phosphorylent et initient une cascade de phosphorylations aboutissant à la phosphorylation de la protéine LuxO. Cette dernière active alors la production de 5 ARNs régulateurs nommés Qrr (quorum regulatory RNA), qui à leur tour vont activer la production du facteur de transcription AphA et réprimer la production du facteur de transcription LuxR (Lilley et Bassler, 2000, Tu et Bassler, 2007). Ce schéma est renforcé par la répression de la production de LuxR par AphA. Ainsi, à faible densité bactérienne, LuxR est peu produit alors que AphA est à son maximum (Fig. 14).

À forte densité bactérienne, la concentration d'AIs dans le milieu est forte. Les récepteurs LuxN, LuxQ et CqsS fonctionnent alors comme des phosphatases et entraînent la déphosphorylation de LuxO. Celle-ci est ainsi inactive et par conséquent, les ARNs Qrr régulateurs ne sont pas produits. LuxR est alors produit à son maximum tandis que la production de AphA est fortement réduite. (Ball *et al.*, 2017). Les facteurs AphA et LuxR sont des régulateurs du QS pouvant à la fois

activer ou réprimer l'expression des gènes. AphA est capable de réguler l'expression de 167 gènes, LuxR de 625 gènes et ensemble les deux facteurs co-régulent 77 gènes. AphA est produit uniquement à faible densité cellulaire alors que LuxR est présent à la fois à faible et forte densités cellulaires. LuxR est ainsi le facteur majeur impliqué dans la régulation du QS (Van Kessel *et al.*, 2013). Chez *V. harveyi*, le QS joue un rôle important dans la régulation des gènes impliqués dans la bioluminescence (Bassler *et al.*, 1994, Manefield *et al.*, 2000), la formation de biofilm, la motilité flagellaire (Yang et Defoirdt, 2015), la production de sidérophores (Lilley et Bassler, 2000, McRose *et al.*, 2018), la production de protéases extracellulaires (Mok *et al.*, 2003, Natrah *et al.*, 2011) et le système de sécrétion de type III (Henke et Bassler, 2004b). De manière générale, à faible densité cellulaire, les facteurs de virulence exprimés permettent aux bactéries d'adhérer aux tissus de l'hôte et favorisent la multiplication bactérienne. En revanche, à forte densité cellulaire, ces facteurs favorisent la dégradation des biofilms et la dispersion des bactéries dans l'environnement (Fig. 14) (Rutherford et Bassler, 2012).

Le gène *toxR* Le gène *toxR* code pour un facteur de transcription transmembranaire identifié chez la plupart des bactéries du genre *Vibrio*. Il a été particulièrement étudié chez *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* (Lin *et al.*, 1993). Chez ces espèces, il a été mis en évidence que le facteur de transcription ToxR avait un rôle dans la régulation des gènes de virulence. Par exemple chez *V. cholerae*, celui-ci est capable de réguler les gènes impliqués dans la production de la toxine cholérique (*ctx*), la synthèse de pili (*tcp*) ou la motilité flagellaire et le chimiotactisme (Bina *et al.*, 2003). Chez *V. harveyi*, ce gène a également été identifié. Il est supposé jouer un rôle dans la régulation de l'expression des gènes de virulence mais ceci n'a pas été démontré (Franco et Hedreyda, 2006).

Les bactériophages Les bactériophages peuvent également moduler la virulence chez *V. harveyi*. Un bactériophage est un virus capable d'infecter les bactéries. Son génome, sous forme d'ARN ou d'ADN, est protégé par une capsule protéique. Lors de l'infection, son matériel génétique est transféré dans le cytoplasme bactérien de façon horizontale. Celui-ci peut alors, soit initier un cycle lytique et entraîner la lyse de la bactérie, soit initier un cycle lysogénique et

intégrer son propre génome au sein du génome bactérien. Le bactériophage devient alors un prophage intégré dans le chromosome de l'hôte ou sous forme de plasmide. Son ADN sera alors simultanément répliqué avec l'ADN bactérien lors de la division cellulaire. Ce cycle peut durer indéfiniment. L'initiation d'un cycle lysogénique par un bactériophage entraîne ainsi un transfert de gènes à la bactérie, pouvant ainsi conférer de la virulence (Fortier et Sekulovic, 2013). Chez *V. harveyi*, au moins deux bactériophages impliqués dans la virulence et infectant préférentiellement cette espèce, ont été identifiés. Oakey et Owens (2000) ont mis en évidence la présence d'un bactériophage de la famille Myoviridae, le *Vibrio harveyi* myovirus-like (VHML), chez une souche de *V. harveyi*, pathogène pour *P. monodon*. Il a été démontré que le transfert du bactériophage VHML dans le génome bactérien de souches de *V. harveyi* non virulentes peut les convertir en souches virulentes. Chez la plupart des souches infectées, le bactériophage induisait une augmentation de l'activité hémolytique, de la sécrétion de protéines et de la mortalité chez les larves de *P. monodon* (Munro et al., 2003). Plus récemment, Khemayan et al. (2012) ont mis en évidence la présence du bactériophage *Vibrio harveyi* siphophage 1 (VHS1) chez *V. harveyi*. Il a été démontré que le transfert de VHS1 dans le génome bactérien de *V. harveyi* induisait une virulence ainsi qu'une mortalité accrue pour *P. monodon* mais pas pour *Penaeus [Litopenaeus] vannamei*. Ce bactériophage serait impliqué dans la production de toxines extracellulaires associées à l'agglutination d'hémocytes.

L'ensemble de ces facteurs de virulence, éventuellement présents chez *V. harveyi*, explique sa dangerosité potentielle et la nécessité, dans les élevages aquacoles, d'être capable d'identifier et de détecter cet agent potentiellement pathogène, rapidement et de façon fiable

4. Méthodes de détection et d'identification de *Vibrio harveyi*

La détection précoce d'agents pathogènes, est primordiale pour assurer une gestion efficace de la vibriose au sein d'une structure aquacole. Dans un premier temps, la surveillance revêt une importance fondamentale afin de prévenir la diffusion des maladies et d'améliorer les connaissances des facteurs épidémiologiques impliqués dans leur apparition et leur propagation.

Dans un second temps, lors d'un épisode de vibriose, l'établissement d'un diagnostic rapide est crucial pour mettre en place des mesures de contrôle ciblées et efficaces. Il est ainsi indispensable d'utiliser des méthodes fiables, permettant une identification rapide de l'agent pathogène, en particulier *V. harveyi*.

4.1. Méthodes culturales de croissance et identification phénotypique

Milieux sélectifs Le TCBS (Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose) est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement et la purification des bactéries du genre *Vibrio*. Il fait partie des milieux sélectifs de référence de la norme ISO (2017) pour l'isolement de *Vibrio* pathogènes. Sur ce milieu de couleur verte, les souches capables de fermenter le saccharose forment des colonies jaunes alors que les autres forment des colonies vertes. Les colonies de *Vibrio harveyi* peuvent ainsi apparaître jaunes ou vertes en raison de variations intraspécifiques (Fig. 15). Toutefois, leur aspect peut différer entre des cultures de 24 h et des cultures plus âgées de 48 h ou réfrigérées. La lecture des boîtes est ainsi préconisée sur des cultures récentes.

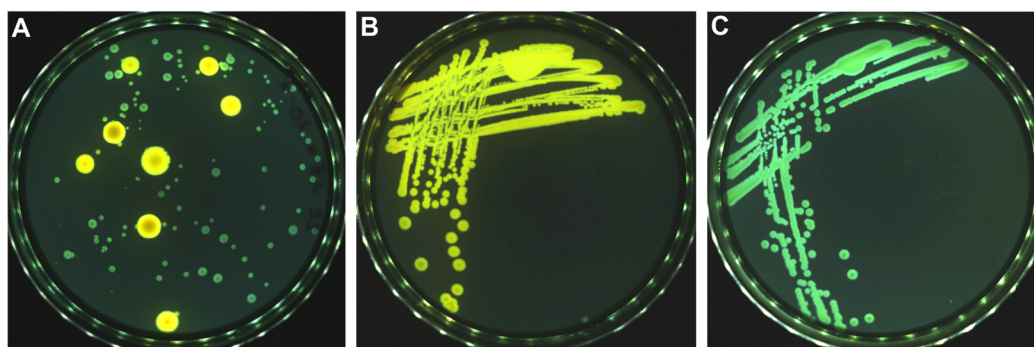


Figure 15 : Photographies de colonies sur milieu gélosé TCBS après incubation 24 h à 37 °C. A. Isolement d'eau de mer. B. Isolement de la souche *Vibrio harveyi* de référence LMG 4044. C. Isolement de la souche *Vibrio harveyi* de référence LMG 18298.

Bien qu'à l'origine ce milieu ait été mis au point pour l'isolement des espèces *Vibrio cholerae* et *V. parahaemolyticus*, celui-ci est adapté à la croissance de la plupart des *Vibrio* (Kobayashi *et al.*, 1963). Néanmoins, certaines espèces telles que *Vibrio penaeicida* et *Vibrio gazogenes* n'ont pas la capacité de croître sur ce milieu. D'autres espèces telles que *Vibrio cincinnatiensis*,

Vibrio metschnikovii et *Vibrio hollisae* ont une croissance très faible (Farmer *et al.*, 1988, Gomez-Gil et Roque, 2006). La sélectivité du TCBS repose sur la présence de bile empêchant la croissance des bactéries Gram-positif et coliformes. Il a toutefois été rapporté que certaines souches d'*Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Staphylococcus* et *Streptococcus* ont une croissance légère sur TCBS (Nicholls *et al.*, 1976).

Pour faire face à ces divers inconvénients, un autre milieu sélectif a été mis au point dans le but d'isoler et de distinguer spécifiquement *V. harveyi* : *Vibrio harveyi* agar (VHA) (Harris *et al.*, 1996). La distinction de *V. harveyi* parmi les *Vibrio*, capables de croître sur le VHA, repose sur la capacité de cette espèce à utiliser le cellobiose et l'ornithine. Les colonies formées par *V. harveyi* apparaîtront ainsi petites, vert clair avec un centre plus foncé et un halo jaune. Néanmoins, il a été démontré que la présence d'ornithine décarboxylase n'est pas un critère caractéristique suffisant pour différencier *V. harveyi* de *V. campbellii*. D'autres études sont donc nécessaires pour valider la spécificité de l'identification réalisée grâce à ce milieu (Gomez-Gil et Roque, 2006).

Tests biochimiques L'identification à l'aide de tests biochimiques est longue et fastidieuse (Bonnin-Jusserand *et al.*, 2017). D'une part, il existe d'importantes variations phénotypiques intraspécifiques, et d'autre part certaines espèces de *Vibrio* telles que *V. harveyi* et *V. alginolyticus* ont des profils phénotypiques très similaires (Buller, 2014). Il est ainsi difficile d'identifier de façon fiable les espèces de *Vibrio* issues de l'environnement telles que *V. harveyi* à l'aide du système de Galerie API 20E (BioMérieux), en partie du fait du manque de données existantes dans les différentes bases de données (Bauer *et al.*, 2018).

Tests sérologiques Une alternative aux tests biochimiques a émergé grâce au développement des tests sérologiques. La plupart des tests, sont disponibles à un prix relativement coûteux et ont été mis au point pour l'identification des espèces du genre *Vibrio* représentant un risque pour la santé humaine tel que *Vibrio cholerae*, avec notamment le Cholera Smart O1 (Hasan *et al.*, 1994). Afin de détecter *V. harveyi* dans des crevettes et l'eau d'élevage, Robertson *et al.* (1998) ont développé un test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay),

basé sur des anticorps polyclonaux. Toutefois ce test manquait de spécificité puisque l'espèce *V. campbellii* était également détectée.

Les limites de ces différentes méthodes ont conduit au développement de méthodes d'identification moléculaire.

4.2. Techniques de biologie moléculaire

Différentes techniques de biologie moléculaire ont été élaborées pour l'identification de l'espèce *V. harveyi*. Celles-ci reposent sur l'hybridation moléculaire, la réaction de polymérisation en chaîne ou le séquençage des acides nucléiques. Certaines de ces techniques, telles que l'hybridation ADN-ADN (DDH), AFLP (Amplified Fragment-Length Polymorphism), rep-PCR (repetitive extragenic palindromic PCR), et RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) sont basées sur l'étude du génome entier alors que d'autres telles que la MLSA (MultiLocus sequence analysis), la PCR (Polymerase Chain Reaction) et la PCR en temps réel ciblent préférentiellement un ou plusieurs gènes. Les techniques basées sur l'analyse d'un seul gène ont l'avantage d'être facilement applicables au quotidien, en offrant un résultat rapide et moins coûteux. Plus particulièrement, la PCR en temps réel ou PCR quantitative (q-PCR) procure non seulement une identification fiable et rapide mais également une quantification de l'agent pathogène directement dans l'échantillon environnemental. Cette méthode peut ainsi être utilisée d'une part, par les entreprises aquacoles pour surveiller la présence et l'abondance d'un agent pathogène à des endroits clés de la structure et d'autre part, dans le domaine de la recherche pour étudier la dynamique spatiale et temporelle d'un agent pathogène et déterminer ainsi les facteurs épidémiologiques impliqués dans le déclenchement et la propagation de la vibriose. De ce fait, seule cette technique sera détaillée dans cette partie (pour plus de détails : [Cano-Gomez et al. \(2009\)](#)).

La technique de PCR est apparue pour la première fois dans les travaux de [Mullis et al. \(1986\)](#). Celle-ci repose sur une réaction enzymatique *in vitro* permettant l'amplification d'un ADN cible. Elle nécessite la mise au point en amont d'amorces d'ADN, capables de s'hybrider spécifiquement

aux extrémités de la région à amplifier. Au cours de la réaction, des variations cycliques de température, générées grâce à un thermocycleur, vont engendrer de manière successive, la dénaturation de l'ADN double brin en ADN simple brin, l'hybridation des amorces et l'amplification de l'ADN cible par l'ADN polymérase. La succession des cycles va ainsi permettre une amplification exponentielle de l'ADN cible. Cette technique a suscité un engouement particulier pour le diagnostic en raison de sa haute sensibilité et spécificité, aboutissant à l'apparition de nouvelles technologies permettant le perfectionnement de cette méthode et l'apparition de la q-PCR (Millar *et al.*, 2007).

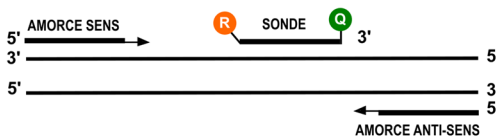
La technique de q-PCR est apparue pour la première fois dans les travaux de Higuchi *et al.* (1993). Cette technique est très similaire à la technique de PCR conventionnelle. La différence repose sur le fait que, au cours de la réaction de q-PCR, la quantité de produits amplifiés, ou amplicons, est mesurée en temps réel par un système de marqueur fluorescent. Le signal de fluorescence émis est directement proportionnel à la concentration d'ADN. Ainsi la corrélation linéaire entre la quantité d'ADN et l'intensité du signal de fluorescence permet de déterminer la quantité d'ADN initialement présente dans l'échantillon. Deux technologies de marqueurs fluorescents sont couramment utilisées : la technologie en sonde TaqMan® et la technologie SYBR® Green I (Arya *et al.*, 2005). Le mécanisme de ces deux technologies est détaillé dans la Figure 16 (p.56).

La différence entre ces deux systèmes repose sur la spécificité de la réaction de fluorescence. En effet, la fluorescence émise par une sonde TaqMan® témoigne d'une amplification plus spécifique que celle générée par le SYBR® Green I. La sonde TaqMan® correspond à un brin d'oligonucléotide sur lequel est fixé un reporter à l'extrémité 3' dont la fluorescence est initialement inhibée par le quencher fixé à l'extrémité 5'. Ce brin a été mis au point pour s'hybrider de manière spécifique sur une séquence d'ADN cible. Lors de la polymérisation, l'ADN polymérase va hydrolyser la sonde, grâce à son activité 5'-exonucléasique, et va libérer le reporter du quencher, générant une fluorescence. Ainsi, la spécificité de la sonde permet de garantir que le signal de fluorescence est le témoin d'une amplification spécifique. En revanche, le SYBR®

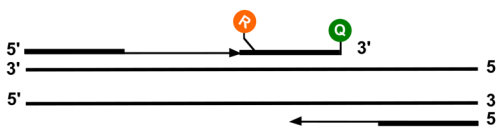
Green I est un agent intercalant capable de s'intercaler entre n'importe quel ADN double brin. La spécificité de la réaction repose donc entièrement sur la spécificité des amorces. Néanmoins, l'avantage de cette technique s'appuie sur le fait qu'elle ne nécessite pas d'expertise pour l'élaboration d'une sonde : elle est ainsi plus simple à mettre en place et moins coûteuse (Fig. 16) (Arya *et al.*, 2005).

Technologie TaqMan®

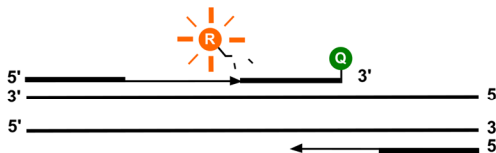
1. Hybridation: Les amorces et la sonde s'hybrident de manière spécifique à l'ADN cible. Un fluorochrome émetteur (reporter) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3'.



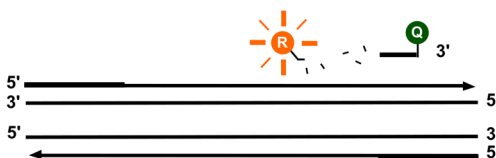
2. Polymérisation: Le produit de PCR est généré grâce à l'ADN polymérase. Tant que la sonde est intact, l'émission du reporter est inhibée par le quencher.



3. Clivage de la sonde: Lors de chaque cycle, l'ADN polymérase clive le reporter de la sonde grâce à son activité 5'-exonucléasique.



4. Fin de la polymérisation: Une fois séparé du quencher, le reporter émet une fluorescence. A chaque cycle, le signal de fluorescence augmente.

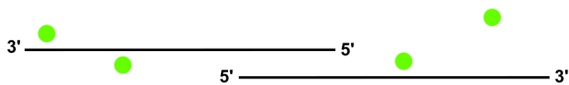


Technologie SYBR® Green I

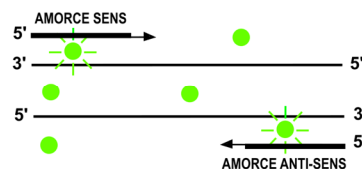
1. Principe de réaction: Le SYBR® Green I émet de la fluorescence lorsqu'il s'intercale dans l'ADN double brin.



2. Dénaturation: Lorsque l'ADN est dénaturé le SYBR® Green I est libéré et la fluorescence est inhibée.



3. Hybridation et polymérisation: Après l'hybridation des amorces, le produit de PCR est généré grâce à l'ADN polymérase.



4. Fin de la polymérisation: Le SYBR® Green s'intercale dans l'ADN double brin. A chaque cycle, le signal de fluorescence augmente.

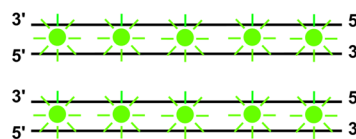


Figure 16 : Schéma permettant de comparer le mécanisme de la technologie en sonde TaqMan® et SYBR® Green (adapté de Applied Biosystems (2020)).

Les méthodes d'identification par PCR ou q-PCR reposent sur l'identification de marqueurs ou gènes cibles spécifiques au genre ou à l'espèce bactérienne. Ces marqueurs doivent d'une part être bien conservés au sein de l'espèce ciblée et d'autre part posséder un pouvoir discriminant

important, autrement dit une similarité inter-espèces faible. Ces deux critères permettent de garantir l'inclusivité et la spécificité de la méthode. En raison de l'importante similarité des séquences génétiques des espèces de *Vibrio* et plus spécifiquement du clade Harveyi, l'identification à l'espèce de *V. harveyi* est rendue complexe. Il en résulte des erreurs d'identification entre les espèces les plus proches de *V. harveyi* : *V. campbellii* et *V. rotiferianus*. En effet, ces trois espèces partagent 99 % de similarité au niveau de la séquence codant pour l'ARNr 16S (Gomez-Gil *et al.*, 2003, Gomez-Gil *et al.*, 2004). Cette séquence possède ainsi un pouvoir discriminant faible et semble ici peu appropriée pour différencier les espèces au sein du clade Harveyi. Différentes séquences d'amorces ont ainsi été dessinées sur différents gènes cibles potentiels, afin d'identifier spécifiquement *V. harveyi* par techniques de PCR ou q-PCR. Le Tableau 4 répertorie les différentes amorces retrouvées dans la littérature.

Tableau 4 : Liste non exhaustive des différentes amorces, rencontrées dans la littérature, mises au point pour l'identification spécifique de *Vibrio harveyi*.

Gène cible	Produit de gène	Nom de l'amorce	Séquence nucléotidique (5'-3')	Taille du produit amplifié (pb)	Remarques	Références
<i>rrn</i>	ARN ribosomal 16S	VH-1	AACGAGTTATCTGAACCTTC	1300	Amplification des deux espèces <i>V. harveyi</i> et <i>V. alginolyticus</i> . Ces espèces peuvent ensuite être distinguées par un test biochimique simple.	Oakey <i>et al.</i> (2003)
		VH-2	GCAGCTATTAACCTACTACTACC			
		VHARF	CCGCATAATACCTACGGGTC	967	Sous-estimation de la quantité de <i>V. harveyi</i> en présence de <i>V. campbellii</i> ou <i>V. rotiferianus</i> . En effet, bien que la sonde TaqMan dessinée soit spécifique à <i>V. harveyi</i> , les amorces s'hybrident également sur les séquences de <i>V. campbellii</i> et <i>V. rotiferianus</i> .	(Fukui et Sawabe, 2008)
		VHARR	ACCCGAAGTGCTGGCAAACA			
<i>gyrB</i>	Sous-unité B de l'ADN gyrase	A2 B3	TCTAACTATCCACCGCGG AGCAATGCCATCTTCACGTTC	363	<i>gyrB</i> manque de pouvoir discriminant. D'autres études sont nécessaires afin de valider la spécificité de ces amorces. Par exemple l'espèce <i>V. rotiferianus</i> n'a pas été testée.	Thaithongnum <i>et al.</i> (2006)
<i>toxR</i>	Protéine transmembranaire régulatrice de transcription	Vh_toxR-F	TTCTGAAGCAGCACTCAC	390	Résultats faux négatifs pour les souches VIB 391 et STD 3-101 identifiées comme <i>V. harveyi</i> .	Conejero et Hedreyda (2003)
		Vh_toxR-R	TCGACTGGTGAAGACTCA			
		toxRF1	GAAGCAGCACTCACCGAT	382	Les espèces du clade Harveyi telles que <i>V. rotiferianus</i> , <i>V. owensii</i> , <i>V. azureus</i> ... n'ont pas été testées. Seule une souche de <i>V. campbellii</i> de référence a été testée.	Pang <i>et al.</i> (2006)
		toxRR1	GGTGAAGACTCATCAGCA			
toxR F1	CCACTGCTGAGACAAAAGCA	162	Cette étude a été réalisée en technologie TaqMan®. Plusieurs espèces du clade Harveyi telles que <i>V. owensii</i> , <i>V. azureus</i> , <i>V. natriegens</i> ou <i>V. jasicida</i> n'ont pas été testées.	Schikorski <i>et al.</i> (2013)		
toxR R1	GTGATTCTGCAGGGTTGGTT					
torR P1	CAGCCGTCGAACAAGCACCG					
<i>rpoB</i>	Sous-unité β de l'ARN polymérase	VH-4F VH-7F	GTGATGAAGAAGCTTATCGCGATT CGCCTTCTTCAGTTAACGCAGGA	601	Les espèces du clade Harveyi telles que <i>V. rotiferianus</i> , <i>V. owensii</i> , <i>V. azureus</i> ... n'ont pas été testées. Seule une souche de <i>V. campbellii</i> de référence a été testée.	Kim <i>et al.</i> (2014b)

Gène cible	Produit de gène	Nom de l'amorce	Séquence nucléotidique (5'-3')	Taille du produit amplifié (pb)	Remarques	Références
<i>vvh</i>	Hémolysine	VHF1	ATCATGAATAAACTATTACGTTACT	1257	<i>vvh</i> est impliqué dans la virulence. Certains auteurs ont démontré que ce gène n'est pas présent chez toutes les souches de <i>V. harveyi</i> (Zhang <i>et al.</i> , 2001). De plus il peut être sujet au phénomène de transfert horizontal de gènes (Waldor et Mekalanos, 1996, Cano-Gomez <i>et al.</i> , 2009, Izumiya <i>et al.</i> , 2011).	Zhang <i>et al.</i> (2001) Conejero et Hedreyda (2004)
		VHR1	GAAAGGATGGTTTGACAAT			
		VhhemoR	GCTTGATAACACTTTGCGGT	308 avec VHF1		
<i>luxN</i>	Récepteur de LuxM/N du quorum sensing	fluxN rluxN	CTGTGTACTIONACTGTTTATC GTCTAATTCGCGTTCTCCA	2048	Deux souches de <i>V. campbellii</i> sont ressorties positives suite à l'utilisation de ces amorces, démontrant leur manque de spécificité (Cano-Gomez <i>et al.</i> , 2009).	Bassler <i>et al.</i> (1993)
<i>topA</i>	Topoisomérase I	Vh.topA-F Vh.topA-R	TGGCGCAGCGTCTATACG TATTTGTCACCGAACTCAGAACC	121	Plusieurs espèces du clade Harveyi telles que <i>V. owensii</i> , <i>V. azureus</i> , ou <i>V. jasicida</i> n'ont pas été testées.	Cano-Gomez <i>et al.</i> (2015)
<i>hly</i>	Hémolysine	Vh-hly1F Vh-hly1R	GAGTTCGGTTTCTTTCAAG TGTAGTTTTTCGCTAATTC	454	Les espèces du clade Harveyi telles que <i>V. rotiferianus</i> , <i>V. owensii</i> , <i>V. azureus</i> ou <i>V. jasicida</i> n'ont pas été testées. De plus le gène <i>hly</i> est impliqué dans la virulence. Il peut donc être sujet au transfert horizontal de gènes et entraîner l'obtention de faux positifs ou faux négatifs (Izumiya <i>et al.</i> , 2011).	Haldar <i>et al.</i> (2010a)
<i>vhhP2</i>	Protéine membranaire	F6 R4	TGGATGTAAATGAGTTTGG CGTTACGATTATTTGATAG	159	Une souche de <i>V. campbellii</i> est ressortie positive suite à l'utilisation de ces amorces, démontrant leur manque de spécificité.	Sun <i>et al.</i> (2009)

Les méthodes de PCR et q-PCR se sont néanmoins avérées coûteuses pour une application au quotidien. De nombreux laboratoires vétérinaires se sont donc tournés vers des techniques d'identification par spectrométrie de masse moins onéreuses.

4.3. Analyse protéomique par MALDI-TOF MS

La spectrométrie de masse est une technique analytique, apparue au début du XX^{ème} siècle, utilisée pour déterminer la masse moléculaire d'un composé, permettant ainsi la détection et l'identification de molécules (De Hoffmann, 2000). Elle repose sur la mesure du rapport de la masse sur la charge (m/z) d'une molécule préalablement ionisée. Son utilisation était, dans un premier temps, restreinte aux petits composés thermostables. En effet, les techniques d'ionisation de l'époque engendraient une fragmentation excessive de l'échantillon entraînant une perte d'intégrité des molécules (Domon et Aebersold, 2006). Avec l'apparition, dans les années 80, de nouvelles techniques reposant sur une ionisation douce : Electron Spray Ionization (ESI) et Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI), son utilisation a pu s'étendre aux composés organiques complexes tels que les protéines. Ceci a ainsi permis de rendre cette technique applicable à l'identification de bactéries, de virus et de champignons (Singhal *et al.*, 2015).

La technique d'ionisation MALDI s'est avérée plus avantageuse que la technique ESI. En effet, la technique MALDI permet principalement de générer des ions mono-chargés, contrairement à la technique ESI, pouvant générer des ions multichargés. Ainsi, l'interprétation des données issues de la technique MALDI est plus simple. Cette technique repose sur le mélange d'un échantillon avec une solution organique, donneuse de protons, appelée matrice, le tout déposé sur une plaque de métal appelée cible. Généralement, en microbiologie, l'échantillon correspond à une colonie bactérienne. Le solvant organique présent dans la matrice pénètre la paroi bactérienne et en extrait les protéines intracellulaires. Sous l'effet du séchage, l'échantillon et la matrice co-cristallisent (Fig. 17) (Singhal *et al.*, 2015).

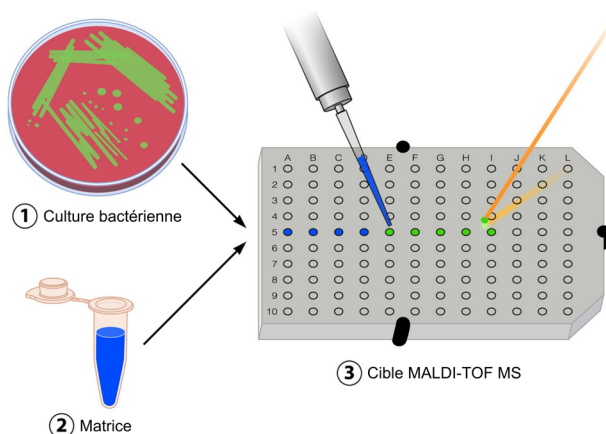


Figure 17 : Schéma général représentant la préparation d'un échantillon bactérien dans le but d'une identification par la technique MALDI-TOF MS (Clark *et al.*, 2013).

Ce dépôt solide est ensuite irradié par un faisceau laser. Ceci entraîne la formation et la désorption (passage en phase gazeuse) d'ions issus du complexe matrice-échantillon. Les ions chargés sont ensuite transférés vers un analyseur permettant une séparation des ions en fonction de leur rapport m/z . L'analyseur le plus communément utilisé en microbiologie est issu de la technologie *Time Of Flight* (TOF) en mode linéaire. Les ions subissent une accélération grâce à l'application d'une différence de potentiel. Ils sont ensuite envoyés dans un tube de vol et séparés en fonction de leur vitesse et donc de leur masse. Les ions atteignent ensuite le détecteur et les signaux reçus sont traités informatiquement. Le rapport m/z est alors déterminé en fonction du temps de vol des ions, c'est-à-dire le temps mis par les ions pour traverser le tube et atteindre le détecteur. Celui-ci est proportionnel à leur masse. Ainsi, plus la masse des ions est faible plus ils atteindront le détecteur rapidement et inversement. Un spectre caractéristique de l'échantillon est alors généré. Ce spectre est ensuite comparé aux spectres existants dans une base de données référente, nommés mass spectra profiles (MSPs) afin d'identifier l'échantillon inconnu. Un score est déterminé afin d'évaluer la qualité d'identification (Fig. 18) (Clark *et al.*, 2013).

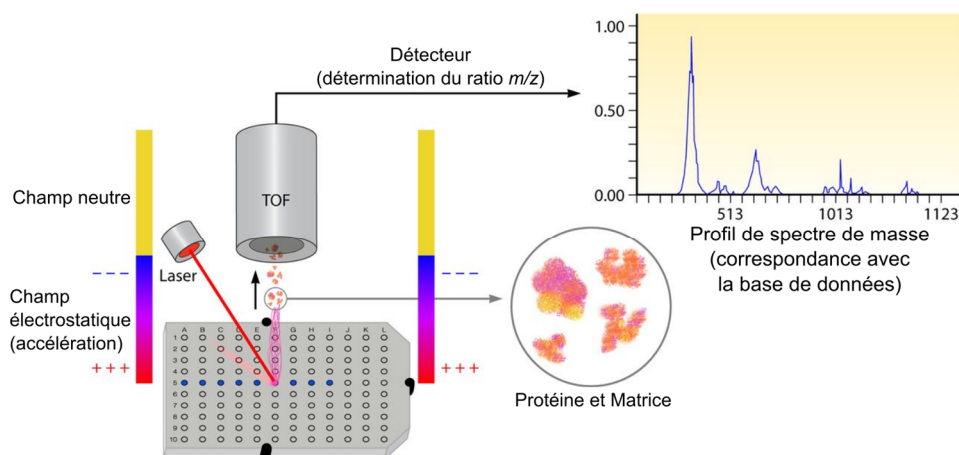


Figure 18 : Schéma général représentant la technique d'analyse d'un échantillon ionisé, par MALDI-TOF MS (Clark *et al.*, 2013).

La technologie MALDI-TOF MS est donc devenue une méthode rapide, fiable et à moindre coût pour l'identification de bactéries. Elle est ainsi couramment utilisée dans les établissements de santé afin de dresser un diagnostic rapide. Elle s'est notamment avérée efficace pour l'identification de pathogènes du genre *Vibrio* isolés chez l'Homme (Hazen *et al.*, 2009), mais également chez des organismes élevés en aquaculture ou dans l'environnement (Dieckmann *et al.*, 2010). Toutefois, cette méthode présente des inconvénients. En effet, l'identification dépend fortement des spectres enregistrés dans la base de données utilisée. Par exemple, l'une des bases de données la plus couramment utilisée : Bruker BioTyper (dernière version 9.0.0.0), a été principalement développée pour l'identification de souches cliniques et manque de souches isolées de l'environnement ou de souches pathogènes animales. Par exemple, elle ne comprend pas les spectres correspondant aux espèces *Vibrio jasicida*, *Vibrio owensii* et *Vibrio sagamiensis* appartenant au clade Harveyi ou même une des espèces de *Vibrio*, pathogène pour l'Homme, la plus connue : *Vibrio cholerae*. Leur identification à l'aide de cette base de données n'est donc aujourd'hui pas possible. Toutefois, afin de pallier ces inconvénients, il est possible de développer de nouvelles bases de données spécifiques. Par exemple, Erler *et al.* (2015) ont mis en place une base de données accessible, VibrioBase, comportant de nombreux spectres caractéristiques d'espèces du genre *Vibrio* isolées de l'environnement. L'utilisation de cette base de données permet donc d'améliorer la spécificité de l'identification obtenue. Enfin, pour être efficace et

reproductible, la méthode doit reposer sur une standardisation robuste. En effet, pour certaines espèces bactériennes, les conditions de culture (milieu, temps d'incubation...) peuvent profondément influencer le profil du spectre obtenu. Malgré ces différences, l'identification reste toutefois possible et le diagnostic peut être, malgré tout, dressé afin de mettre en place et d'appliquer des mesures de contrôle pour lutter contre la vibriose (Valentine *et al.*, 2005)

5. Les moyens de lutte contre la vibriose en aquaculture

Compte tenu de l'impact économique et sanitaire croissant de la vibriose sur l'élevage, de nombreuses recherches sont allouées aux moyens de lutte. La plupart se focalisent sur des méthodes durables visant à limiter l'impact sur l'environnement, la santé animale et la santé humaine, intégrées dans le concept *One Health*. Le consommateur joue un rôle actif dans le développement de ces méthodes, en exigeant des denrées alimentaires plus saines, ainsi que des garanties sur le bien-être animal et le respect de l'environnement. Néanmoins, très peu de ces méthodes sont aujourd'hui autorisées en élevage et la législation en vigueur varie entre les pays.

5.1. Principes de gestion des maladies en milieu aquacole

5.1.1. Déclenchement des maladies

En milieu aquacole, une maladie peut être définie comme tout processus qui limite la productivité (Lucas *et al.*, 2019). Celle-ci peut être d'origine non-infectieuse ou infectieuse. Les maladies non-infectieuses sont généralement associées à l'environnement, la nutrition ou la génétique et se limitent souvent à une ferme. Les maladies infectieuses peuvent se propager d'une ferme à l'autre et sont définies selon une approche intégrative incluant l'hôte, l'agent pathogène et l'environnement. Ainsi, selon Snieszko (1974), « une maladie infectieuse peut se déclencher chez un hôte sensible, suite à l'exposition à un agent pathogène virulent, dans des conditions environnementales favorables ». Un diagramme de Venn (Fig. 19) défini par Snieszko (1974) est communément utilisé pour conceptualiser l'infection et le déclenchement.

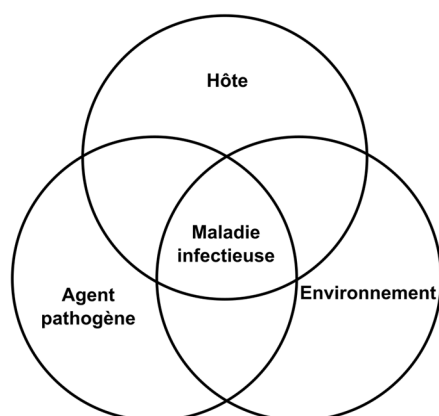


Figure 19 : Diagramme de Venn permettant de conceptualiser le déclenchement d'une maladie infectieuse selon une approche intégrative incluant l'hôte, l'agent pathogène et l'environnement. Issu de [Snieszko \(1974\)](#).

5.1.2. Une stratégie de contrôle holistique

Au tout début de l'aquaculture, certaines stratégies de contrôle se limitaient à la conjecture selon laquelle, l'état optimal correspond à l'absence de pathogène. Seulement, réduire le contrôle d'une maladie à l'éradication du pathogène n'est pas une stratégie durable et rentable. D'une part, les coûts engagés pour une méthode curative sont souvent plus importants que pour une méthode préventive. D'autre part, les systèmes aquacoles étant, pour la plupart, en contact avec l'environnement extérieur, la probabilité de réinfection est importante ([Lucas *et al.*, 2019](#)). Ainsi, une stratégie de contrôle holistique incluant l'hôte, l'agent pathogène et l'environnement s'est imposée comme une stratégie intégrative d'une aquaculture durable, dynamique et compétitive. Cette stratégie intègre en particulier des mesures préventives basées sur une amélioration de la qualité de l'environnement, une amélioration du système de défense immunitaire de l'hôte et une réduction de l'abondance ou de la virulence de l'agent pathogène. Cette stratégie intègre également des mesures curatives basées sur l'élimination de l'agent pathogène en cas de déclenchement de maladie ([Defoirdt *et al.*, 2011](#), [Pérez-Sánchez *et al.*, 2018](#)). La Figure 20 permet de conceptualiser cette stratégie en résumant les différents points de contrôle.

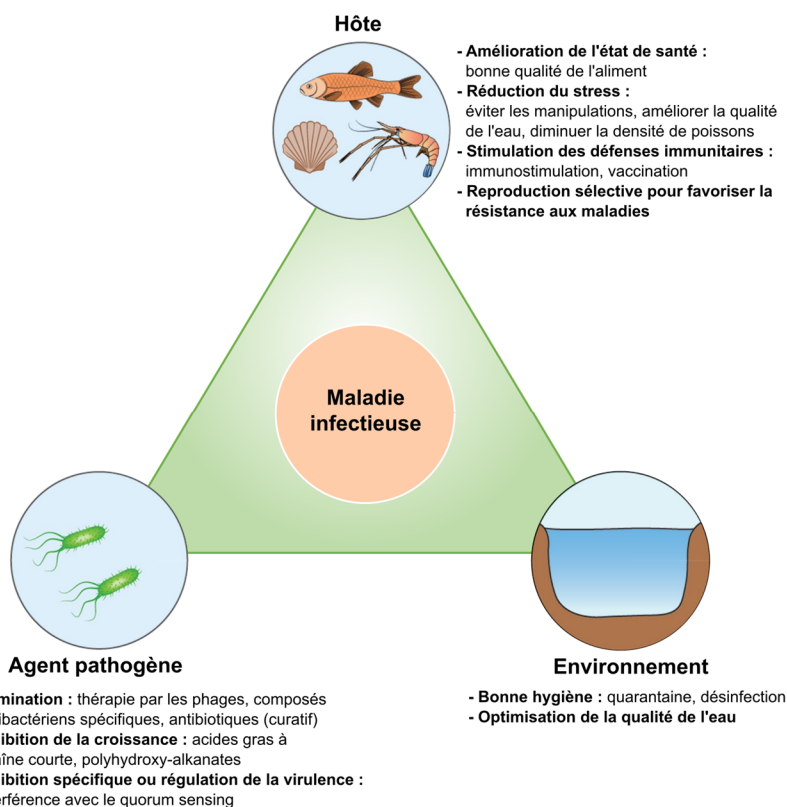


Figure 20 : Schéma conceptualisant le déclenchement d'une maladie infectieuse en aquaculture, ainsi que les stratégies de contrôle préconisées. Adapté de Pérez-Sánchez *et al.* (2018) et Defoirdt *et al.* (2011).

5.2. Les mesures de contrôle appliquées à ce jour

5.2.1. Les pratiques de prévention généralisées

La gestion des maladies en milieu aquacole est intimement liée au mode d'élevage (ouvert, semi-fermé ou fermé) et à la biologie de l'espèce élevée. Toutefois quelques principes généraux sont communément appliqués.

Tout d'abord, une bonne qualité de l'eau, mode de transmission majeur des bactéries, permet de diminuer le risque d'infection bactérienne. Ainsi, il est souvent préconisé de maintenir un débit important, afin d'éviter une multiplication et une accumulation des bactéries. Certains préconisent également de stériliser l'eau *via* des traitements chimiques (chlorine, iodophores, ozone) et physiques (UV). Néanmoins ces méthodes sont plus onéreuses (Lucas *et al.*, 2019).

D'autre part, la propagation d'une maladie est un processus étroitement lié à la densité d'individus (Ina-Salwany *et al.*, 2019). Plus la densité de poisson est élevée, plus la distance entre les individus est réduite, entraînant une augmentation de la probabilité de contact et donc de transmission de la maladie. Réduire la densité des poissons permet donc de réduire la probabilité de propagation d'une maladie. Toutefois, pour qu'une ferme reste compétitive, elle doit trouver un équilibre entre la réduction de la densité et la quantité de production.

La réduction de la densité permet également de réduire le stress ressenti par les individus en diminuant la compétition pour l'espace et la nourriture. En effet le stress peut avoir de lourdes conséquences sur le système immunitaire des poissons et donc augmenter la probabilité d'infection (Vazzana *et al.*, 2002). Afin de réduire le stress, il est aussi conseillé de réduire au maximum toute manipulation et d'augmenter le niveau d'oxygène dissous (Lucas *et al.*, 2019).

5.2.2. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des composés d'origine naturelle ou synthétique capables d'éradiquer ou d'inhiber la croissance d'une bactérie (Serrano, 2005). Ils ont longtemps été utilisés de manière excessive comme agents prophylactiques et thérapeutiques, résultant en l'émergence et la propagation du phénomène d'antibiorésistance. Celui-ci se caractérise chez les bactéries par l'acquisition d'une résistance aux antibiotiques, entraînant une diminution de la sensibilité aux traitements disponibles et donc une persistance des bactéries dans l'élevage. Par exemple, des souches de *Vibrio harveyi* résistantes ont entraîné des mortalités massives dans un élevage de crevettes (*P. monodon*) (Karunasagar *et al.*, 1994). Par ailleurs, le développement de souches multi-résistantes est d'autant plus préoccupant que la gamme d'antibiotiques efficaces est drastiquement réduite, augmentant le risque d'échec thérapeutique. Pour illustration, une souche multi-résistante de *Vibrio parahaemolyticus*, espèce potentiellement pathogène à la fois pour l'Homme et l'animal, a été isolée d'une crevette importée du Vietnam jusqu'en France (Briet *et al.*, 2018).

L'émergence de ce phénomène est non seulement un problème pour la santé animale mais également pour la santé humaine. En effet, les fermes aquacoles sont aujourd'hui considérées comme des réservoirs de gènes de résistance. Ces gènes peuvent non seulement se répandre et se transmettre dans l'environnement *via* transfert horizontal chez les bactéries pathogènes pour l'animal mais également chez les bactéries pathogènes pour l'Homme (Guglielmetti *et al.*, 2009).

Aujourd'hui, malgré la propagation de ce phénomène et sachant que les antibiotiques sont de moindre efficacité contre les biofilms (Arunkumar *et al.*, 2020), ceux-ci sont toujours utilisés en milieu aquacole, en raison d'un manque de méthodes thérapeutiques disponibles sur le marché. Sous la pression des consommateurs mais aussi pour limiter le risque sanitaire, des tentatives de régulation et de limitation ont vu le jour. Celles-ci avaient pour objectif de garantir une utilisation plus rationnelle et responsable des antibiotiques afin de réduire la quantité retrouvée dans les filets de poisson. Ainsi en France, seuls quatre antibiotiques sont aujourd'hui autorisés pour l'élevage de poissons : l'acide oxolinique, la fluméquine, l'oxytétracycline et l'association triméthoprime-sulfadiazine (ANSES, 2010). Toutefois ces régulations divergent d'un pays à l'autre, notamment en Chine et au Vietnam où les régulations sont moins strictes (Lulijwa *et al.*, 2020).

5.2.3. Les vaccins et immunostimulants

Dans l'objectif de diminuer l'utilisation d'antibiotiques, des vaccins ont été élaborés. La vaccination repose sur l'administration d'un agent pathogène mort ou atténué ou uniquement d'un antigène afin d'engendrer une réponse immunitaire spécifique. Le but est de générer une protection durable contre l'agent pathogène grâce au développement d'une mémoire immunologique. L'utilisation de cette méthode requiert donc une bonne compréhension du système immunitaire de l'individu et le développement d'un mécanisme de défense immunitaire spécifique (Wali et Balkhi, 2006).

L'immunité des invertébrés reposant principalement sur des mécanismes innés, la vaccination n'est pas tout à fait adaptée à ces organismes. Pour ces derniers, seuls les immunostimulants,

capables de générer une réaction immunitaire non spécifique, sont généralement préconisés (Smith *et al.*, 2003). L'immunité des poissons reposant à la fois sur des mécanismes innés et acquis, la vaccination est régulièrement employée. En revanche, leur mémoire immunitaire étant relativement courte, plusieurs campagnes de vaccination sont souvent nécessaires. De plus, la vaccination est souvent inefficace dans les stades précoces de développement des poissons, c'est-à-dire chez les larves, puisque ces individus n'ont pas encore l'habilité de développer une réponse immunitaire spécifique (Vadstein, 1997).

De nos jours, la plupart des vaccins contre les bactéries du genre *Vibrio*, disponibles sur le marché pour l'élevage de poissons, sont des vaccins inactivés administrés par injection intrapéritonéale (Ji *et al.*, 2020). Ces derniers sont obtenus à partir de bactéries tuées par des méthodes physiques ou chimiques, après une culture et une amplification bactérienne. Les bactéries perdent leur pathogénie mais pas leurs propriétés antigéniques, ce qui permet d'induire une réponse immunitaire spécifique chez l'individu. Sur le marché, les vaccins disponibles procurent une protection contre une gamme réduite d'espèces de *Vibrio*. En effet, seules les espèces, *Vibrio salmonicida*, *Vibrio anguillarum* et *Vibrio ordalii* sont concernées par ces vaccins. Pourtant, des essais d'élaboration de vaccins contre *Vibrio harveyi* se sont avérés prometteurs pour conférer une protection chez la sole (*Solea senegalensis*), mais ne sont toujours pas commercialisés (Arijo *et al.*, 2005). Ceci est en partie dû au processus d'autorisation de mise sur le marché et de commercialisation, complexe et long.

Afin de pallier le manque de vaccin, les fermes aquacoles ont souvent recours à des auto-vaccins (Dadar *et al.*, 2017). Ces derniers sont en majorité des vaccins inactivés élaborés avec des souches isolées des précédentes épidémies au sein même de la ferme. Toutefois, les auto-vaccins doivent être régulièrement élaborés avec de nouvelles souches pathogènes, d'une part puisque les agents pathogènes présents dans la ferme peuvent évoluer et d'autre part puisque l'élaboration d'un seul vaccin spécifique à une espèce est rendue difficile à cause de l'existence de différents sérotypes (Hastefnl *et al.*, 2005).

5.3. Les mesures de contrôle alternatives

Ainsi, suite à l'émergence du phénomène d'antibiorésistance, à la complexité d'élaboration des vaccins et à leur inefficacité chez les larves, crustacés et mollusques, de nouvelles stratégies de contrôle ont émergé. Les mesures détaillées dans cette partie ont suscité un engouement dans le domaine de la recherche mais ne sont toujours pas appliquées au quotidien dans les fermes aquacoles. Certaines techniques, telles que l'utilisation de composés interférant avec le quorum sensing, sont toujours au stade de développement et n'ont pas encore été testées sur le terrain alors que d'autres, telles que les probiotiques, ont déjà fait leurs preuves (Pérez-Sánchez *et al.*, 2018).

5.3.1. Les probiotiques

Les probiotiques sont définis comme des microorganismes vivants, pouvant avoir un effet bénéfique pour la santé. Ajoutés au régime alimentaire en quantité suffisante, ils peuvent coloniser le microbiote intestinal de l'hôte et permettre, d'améliorer la croissance et de conférer une protection contre les agents pathogènes. Ainsi, il existe différents modes d'action tels que l'amélioration de la digestion et de l'absorption de nutriments, la production de composés inhibiteurs, la compétition pour les nutriments et les sites d'adhésion, ou l'amélioration de la réponse immunitaire. Les probiotiques peuvent également être utilisés pour améliorer la qualité de l'eau environnante. Par exemple, une souche isolée du système digestif de bars communs, *Vibrio lentus*, s'est avérée efficace pour conférer une protection contre la vibriose causée par *Vibrio harveyi* chez les larves de bars communs (Schaeck *et al.*, 2016). Ces derniers peuvent être administrés en tant qu'additif alimentaire avec des prébiotiques, des composés non-digestibles capables de promouvoir la colonisation et la prolifération bactérienne et/ou d'activer le métabolisme des bactéries intestinales résidentes afin d'optimiser l'alimentation, l'absorption de nutriments et l'efficacité des probiotiques. Le mélange de probiotiques et de prébiotiques, communément défini comme des symbiotiques, offre ainsi un effet synergique (Amenyogbe *et al.*, 2020).

En milieu aquacole, divers probiotiques sont aujourd'hui reconnus tels que la levure *Saccharomyces cerevisiae*, ou des bactéries lactiques appartenant au genre *Enterococcus*, *Lactobacillus* ou *Bacillus*. Toutefois, d'après nos connaissances, à ce jour en Europe, très peu de probiotiques sont commercialisés (Dittmann *et al.*, 2017). En effet, bien que les recherches soient fortement encouragées, la détermination du rapport coût-efficacité et l'élaboration de mesures standardisées pour l'évaluation de la réponse et de la toxicité chez un hôte sont requises avant toute utilisation à grande échelle (Lucas *et al.*, 2019).

Il existe également diverses inquiétudes et limitations concernant l'utilisation de probiotiques en aquaculture. Tout d'abord, le microbiote intestinal est un environnement dynamique, ce qui suggère que les probiotiques doivent être administrés régulièrement, engendrant des coûts importants. D'autre part, l'administration sur le long terme d'une quantité importante de bactéries pourrait avoir un impact sur l'environnement. En effet, ces bactéries pourraient acquérir des gènes d'antibiorésistances et les transmettre *via* transfert horizontal de gènes (Newaj-Fyzul *et al.*, 2014). Cependant, une alternative intéressante pourrait être l'utilisation de postbiotiques, c'est-à-dire une préparation d'éléments solubles sécrétés par des bactéries ou libérés lors de la lyse bactérienne, communément définis comme des probiotiques inactivés, mais ceux-ci sont toujours à l'état de recherche (Ang *et al.*, 2020).

5.3.2. Les bactériophages

Les bactériophages (ou phages) sont des virus naturellement présents et abondants dans l'environnement, capables d'infecter les bactéries. L'infection d'une bactérie par un bactériophage lytique entraîne rapidement la lyse de la bactérie ainsi que la prolifération et la libération de nouveaux phages. Ces derniers sont généralement hautement spécifiques à l'espèce voire à certaines souches, ce qui permet d'éliminer spécifiquement le pathogène en minimisant les effets sur les bactéries commensales. Toutefois, cette spécificité peut également être un inconvénient pour le traitement de différentes souches, nécessitant l'élaboration de cocktails de phages et un renouvellement suite à l'évolution des pathogènes dans l'environnement (Oliveira *et al.*, 2012). Récemment, un cocktail de phages lytiques, prometteur pour le traitement de la vibriose en

aquaculture, a été isolé d'une ferme d'élevage de crevettes (*P. monodon*) capable d'infecter diverses souches appartenant à l'espèce *V. harveyi*, *V. alginolyticus* et *V. parahemolyticus* (Stalin et Srinivasan, 2017). De plus, un bactériophage a révélé des propriétés inhibitrices, non seulement sur les bactéries planctoniques, mais également sur les biofilms de *V. alginolyticus* (Kim et al., 2019). Ceci suggère que les phages pourraient également être utilisés comme agents anti-biofilms potentiels.

Aujourd'hui, suite aux besoins grandissants de nouvelles stratégies de contrôle, les recherches sur le développement et l'utilisation des bactériophages en aquaculture ainsi que l'impact d'une utilisation industrielle à grande échelle sont fortement encouragées dans l'UE (Culot et al., 2019). Des inquiétudes émergent quant à la possibilité de développement d'une résistance chez les bactéries. Des résistances pourraient survenir *via* divers mécanismes tels que (i) l'inhibition de l'adsorption du phage, (ii) l'inhibition de l'injection du génome, (iii) les systèmes de restriction-modification qui comprennent des enzymes de restriction digérant l'ADN du phage et des enzymes de méthylation protégeant l'ADN bactérien et (iv) des systèmes d'avortement de l'infection (Abi) entraînant la mort simultanée du phage et de la bactérie (Labrie et al., 2010). De plus, les phages lysogéniques peuvent transférer des facteurs de virulence et des gènes de résistance aux antibiotiques dans le génome bactérien, pouvant ainsi être transmis aux futures générations (Munro et al., 2003, Flegel et al., 2005).

5.3.3. Les composés anti-biofilms

Comme décrit dans la section 2.2.2 (p.31), les biofilms confèrent aux bactéries une résistance aux antibiotiques et représentent un réservoir de souches potentiellement pathogènes en milieu aquacole. De nombreuses recherches se sont donc tournées vers l'identification et l'élaboration de composés anti-biofilms, représentant une perspective intéressante pour le contrôle de la vibriose en milieu aquacole. Ainsi, plusieurs composés d'origine naturelle extraits de végétaux ou issus de l'environnement marin se sont avérés prometteurs en tant que composés anti-biofilms (Adnan et al., 2018, Lu et al., 2019). Ces derniers peuvent affecter la formation de biofilms en inhibant l'adhésion et l'attachement des bactéries au support, la formation de la matrice extracellulaire,

l'agrégation bactérienne et en perturbant les voies de signalisation du quorum sensing. Par exemple, l'acide isolimonique, extrait de graines d'orange amère (*Citrus aurantium*), possède la capacité d'interférer avec les voies de signalisation du quorum sensing de *Vibrio harveyi*, en modulant l'expression du gène *luxO*, engendrant ainsi l'inhibition de la formation de biofilm (Vikram *et al.*, 2011). D'autres composés tels que les nanoparticules ont également suscité beaucoup d'intérêts (Velusamy *et al.*, 2016). Notamment, l'utilisation de nanoparticules d'argent (AgNPs) extraites d'algues rouges (*Gelidiella acerosa*) permet de diminuer la colonisation des bactéries du genre *Vibrio* et d'augmenter la survie des larves d'*Artemia franciscana* à hauteur de 100 %, sans effet toxique notable (Satish *et al.*, 2017).

L'avantage de tels composés repose sur le fait qu'ils n'interagissent pas directement avec la croissance des bactéries, suggérant qu'ils exercent une faible pression sélective et que les risques de développer une résistance sont moindres. Ceci n'a toutefois, toujours pas été prouvé (Defoirdt *et al.*, 2010).

5.3.4. Les revêtements antifouling

Généralement, un biofilm peut initier le développement de biofouling, culminant avec la colonisation des surfaces sous forme de macrofouling. Des revêtements antifouling, voire anti-biofilms, c'est-à-dire des revêtements de surface capables de réduire la cinétique de développement du biofouling ont ainsi été mis au point. Il en existe deux types : des revêtements dont les caractéristiques de surface vont impacter l'adhésion des organismes, et des revêtements agissant par libération de molécules actives, généralement des biocides (Fitridge *et al.*, 2012).

Ceux-ci ont été particulièrement utilisés en milieu aquacole. Des revêtements composés de cuivre sont régulièrement appliqués sur les filets des cages en mer, permettant de prévenir le biofouling. Toutefois, des inquiétudes émergent quant à l'impact du cuivre sur l'environnement. Celui-ci pourrait s'accumuler dans les sédiments et aurait des effets néfastes sur les organismes présents aux alentours des fermes aquacoles, comme les palourdes (*Tapes philippinarum*) (Munari *et Mistri*, 2007). Il a également été démontré qu'une exposition au cuivre peut affecter le système

immunitaire du bar commun, le rendant plus sensible aux infections (Cotou *et al.*, 2012). Des restrictions quant à l'utilisation de cuivre commencent à émerger, et par conséquent la recherche d'alternatives est fortement encouragée (Floerl *et al.*, 2016).

Ainsi, aujourd'hui, des recherches visant à réduire la dissémination du cuivre dans l'environnement (Liu *et al.*, 2017) ou visant à développer des revêtements à effet de surface dépourvus de biocides (Nir et Reches, 2016) ont été entreprises. D'autres recherches se focalisent sur le développement de revêtements antifouling incorporant des composés d'origine naturelle (Almeida et Vasconcelos, 2015). Toutefois, à ce jour l'utilisation de tels revêtements n'est pas autorisée en milieu aquacole (Bannister *et al.*, 2019).

Pour conclure, de nos jours, en Europe très peu de méthodes prophylactiques et curatives, permettant de lutter contre la vibriose causée par *V. harveyi*, sont disponibles pour l'élevage du bar commun. Compte tenu de son impact économique et sanitaire, et des inquiétudes relatives à sa propagation liée au réchauffement climatique, il est crucial d'identifier des méthodes de prévention efficaces. Aujourd'hui, ces dernières résident dans la compréhension de la dynamique bactérienne et dans la connaissance des mécanismes de déclenchement des maladies, au sein des fermes aquacoles.

Chapitre II.

Développement d'une PCR en temps réel pour la détection et la quantification de *Vibrio harveyi* en milieu aquacole

Sommaire

1. Contexte	76
2. Mise au point de la PCR en temps réel.....	77
2.1. Conception des amorces.....	77
2.2. Sélection des couples d'amorces	78
2.3. Optimisation.....	80
2.3.1. Sélection du kit de pré-mix.....	80
2.3.2. Sélection de la température d'hybridation	81
3. Adaptation au traitement d'échantillons environnementaux	82
3.1. Echantillons d'eau	82
3.2. Echantillons de biofilms.....	84
4. Validation et application de la PCR en temps réel : Article 1.....	86
Article 1.....	87
Abstract.....	87
1. Introduction.....	88
2. Materials and methods.....	90
3. Results.....	98
4. Discussion	104
5. Conclusion	107
References.....	108
Supplemental data.....	111
Schéma de synthèse.....	115

1. Contexte

Afin de suivre l'évolution, au cours du temps, de l'abondance de l'espèce *Vibrio harveyi* au sein d'Aquanord-Ichtus, la méthode de PCR en temps réel a été choisie pour quantifier les bactéries dans l'eau d'élevage et les biofilms formés sur les parois des bassins. Selon nos connaissances, seulement deux études, décrivant des méthodes de PCR en temps réel pour la quantification de *V. harveyi*, ont été publiées : la méthode développée par Fukui et Sawabe (2008) permet de cibler le gène *gyrB* et celle de Schikorski *et al.* (2013) permet de cibler le gène *toxR* et le plasmide pVCR1, impliqués dans la pathogénie des ormeaux (*Haliotis tuberculata*). Ces méthodes ont été mises au point pour des échantillons d'eau de mer provenant d'élevages d'ormeaux et/ou des échantillons d'hémolymphe d'ormeaux et n'ont pas été adaptées pour traiter des échantillons de biofilms. Celles-ci ont été développées avec une technologie TaqMan®. Par ailleurs, Fukui et Sawabe (2008) ont mis en évidence un manque de spécificité de leurs oligonucléotides, entraînant un manque de fiabilité dans l'estimation de la quantité de *V. harveyi* présente dans les échantillons.

L'objectif de ce chapitre consiste à relater la mise au point d'une PCR en temps réel, permettant de quantifier spécifiquement *V. harveyi*, à la fois, dans des échantillons d'eau de mer et de biofilms. Nous avons tout d'abord choisi de mettre au point la PCR en temps réel avec la technologie SYBR Green I plutôt que la technologie TaqMan®, en raison d'un faible coût, d'une facilité de mise au point et d'optimisation. Ainsi, 3 paires d'amorces ont été choisies : (i) des amorces ciblant le gène *toxR*, codant pour un régulateur transcriptionnel, largement utilisé dans la littérature (Pang *et al.*, 2006, Schikorski *et al.*, 2013), ainsi que des amorces ciblant les gènes (ii) *topA*, codant pour la topoisomérase I, et (iii) *mreB*, codant pour une protéine du cytosquelette, dont la concaténation des loci permet de différencier les espèces proches de *V. harveyi* (Cano-Gomez *et al.*, 2011). Un protocole d'échantillonnage a également été mis au point afin de collecter et d'extraire l'ADN des bactéries présentes dans l'eau des bassins et les biofilms sur les parois des bassins. Ce travail a fait l'objet d'une valorisation par une publication dans le journal *Aquaculture* (Mougin *et al.*, 2020a).

2. Mise au point de la PCR en temps réel

Les amorces ciblant les gènes *toxR* et *topA* étaient déjà présentes dans la littérature (Pang *et al.*, 2006, Cano-Gomez *et al.*, 2015). Néanmoins, selon nos connaissances, aucune paire d'amorces ciblant le gène *mreB* n'avait été mise au point. Nous avons donc, dans un premier temps, conçu ces amorces.

2.1. Conception des amorces

Deux alignements ont été réalisés à partir des séquences de gènes *mreB* référencées dans la base de données GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI). Un premier alignement a permis d'identifier des zones hautement conservées au sein de l'espèce *V. harveyi*. Un deuxième alignement a permis d'identifier des zones de variabilité interspécifique au sein des espèces proches de *V. harveyi* : *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. mimicus*, *V. natriegens*, *V. owensii*, *V. parahaemolyticus* et *V. rotiferianus*. Au total, 7 amorces ont été sélectionnées. Leurs caractéristiques ont été déterminées à l'aide de Oligo Calculator ver. 3.27 (Kibbe, 2007) et Primer3Plus (Rozen et Skaletsky, 2000) et l'analyse de spécificité *in silico* a été réalisée à l'aide d'un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) nucléotidique (Tab. 5).

Tableau 5 : Caractéristiques et analyse de spécificité *in silico* des séquences sens (forward, notées F) et antisens (reverse, notées R) mises au point. pb : paires de bases.

Nom	Séquences 5'-3'	Taille (pb)	Ta (°C)	%GC	Résultat du Blastn (100 % ID)
mreB4R	CACCTGTTAACACCATACCG	20	61,3	50,0	<i>V. harveyi</i>
mreB9F	ATTACAAGAGCCACTGTCAGG	21	61,4	47,6	<i>V. harveyi</i>
mreB9bisR	CCTGACAGTGGCTCTTGTA	20	60,8	50,0	<i>V. harveyi</i>
mreB11F	TGAAGCTGTGATCAACTACG	20	59,0	45,0	<i>V. harveyi</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. rotiferianus</i> , <i>V. owensii</i>
mreBbis11R	GTACGTAGTTGATCACAGCTTCA	23	59,9	43,5	<i>V. harveyi</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. owensii</i>
mreB12F	GGTCTGCGTGTCTCTGA	17	57,7	58,8	<i>V. harveyi</i>

Nom	Séquences 5'-3'	Taille (pb)	Ta (°C)	%GC	Résultat du Blastn (100 % ID)
mreB7F	TTCGTGAATCTGCACTAGG	19	59,6	47,4	<i>V. harveyi</i> , <i>V. owensii</i> , <i>V. campbellii</i>

2.2. Sélection des couples d'amorces

À partir de ces 7 amorces, 5 couples d'amorces, permettant d'amplifier des fragments d'ADN entre 100 et 300 paires de bases (pb), ont pu être élaborés. La synthèse des amorces a été effectuée par la société TIB MOLBIOL (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Allemagne).

Dans un premier temps, l'analyse de spécificité expérimentale des couples d'amorces a été réalisée à l'aide de 4 souches de collection : 2 souches de *V. harveyi* LMG 4044 et LMG 7890, 1 souche de *V. campbellii* CIP 70.67 et 1 souche de *V. owensii* LMG 4043. L'objectif était d'avoir un aperçu de la spécificité des 5 couples d'amorces et de vérifier la non-amplification de composés non spécifiques. À terme, cet essai a permis de sélectionner le couple d'amorces le plus prometteur pour réaliser la suite des expérimentations.

Lors de cet essai, les quatre souches ont été cultivées sur milieu gélosé LBS (Luria-Bertani supplémenté avec 20 % NaCl) pendant 24 h à 37 °C. Leur ADN a été extrait à l'aide de l'appareil QIAcube Connect (Qiagen, Hilden, Allemagne) en utilisant le kit DNeasy Blood&Tissue kit (Qiagen). La pureté et la quantité des ADNs ont été vérifiées à l'aide d'un spectrophotomètre DeNovix DS-11 (Clinisciences, Nanterre, France). Une PCR en temps réel a alors été réalisée sur un appareil LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, France) à l'aide du Master Mix LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics) selon les préconisations des fabricants. Les essais ont été réalisés avec une température d'hybridation de 60 °C, en triplicatas pour chaque échantillon. Le détail des résultats d'amplification et l'analyse de la courbe de fusion sont disponibles dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Résultats d'amplification et analyse de la courbe de fusion des essais réalisés sur les 5 couples d'amorces. Les moyennes et les écarts types ont été obtenus à partir de triplicatas. pb : paires de bases.

No.	Couple	Amplicon (pb)	Moyenne des C _T ± écart type					Analyse de la courbe de fusion				
			Témoins positifs		Témoins négatifs			Témoins positifs		Témoins négatifs		
			<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. campbellii</i>	<i>V. owensii</i>	Mélange réactionnel	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. campbellii</i>	<i>V. owensii</i>	Mélange réactionnel
			LMG	LMG	CIP	LMG		LMG	LMG	CIP	LMG	
			4044	7890	70.67	4043		4044	7890	70.67	4043	
1	mreB9F/ mreB4R	110	10,33 ± 0,08	10,21 ± 0,07	33,39 ± 0,43	37,10 ± 1,16	37,3 ± 0,99	+	+	+	~	~
2	mreB11F/ mreB9bisR	215	14,46 ± 0,62	11,24 ± 0,36	ND	ND	ND	+	+	-	-	-
3	mreB11F/ mreB4R	302	18,38 ± 0,45	12,56 ± 0,25	22,54 ± 0,23	ND	ND	+	+	+	-	-
4	mreB12F/ mreBbis11R	154	11,2 ± 0,06	10,34 ± 0,12	33,63 ± 1,62	34,64 ± 0,54	35,6 ± 1,46	+	+	+	~	~
5	mreB7F/ mreBbis11R	231	14,37 ± 0,99	10,34 ± 0,29	16,99 ± 0,54	15,67 ± 0,13	ND	+	+	+	+	-

+ Présence d'un seul pic de fusion

~ Présence de pics de fusion à des T_m (« melting temperature » ou température de fusion) différentes de celle des pics détectés chez les témoins positifs

- Absence de pic de fusion

ND, non détecté

Dans un premier temps, l'apparition de pics de fusion dans le mélange réactionnel contenant uniquement les couples d'amorces 1 et 4, démontre la présence d'amplification d'ADNs non spécifiques, potentiellement des dimères d'amorces. Les couples 1 et 4 ont donc été éliminés. Dans un second temps, des pics de fusion ont été détectés chez les témoins négatifs, à des T_m identiques aux pics détectés chez les témoins positifs, pour les couples 3 et 5. De plus, les valeurs de C_T étaient inférieures à 23. Ceci témoigne d'une amplification non spécifique à l'espèce *V. harveyi* pour les couples 3 et 5. Ces derniers ont donc également été éliminés. Enfin, le couple 2 (mreB11F/mreB9bisR) présentant un seul pic de fusion uniquement pour les témoins positifs, a été sélectionné pour poursuivre les expérimentations.

2.3. Optimisation

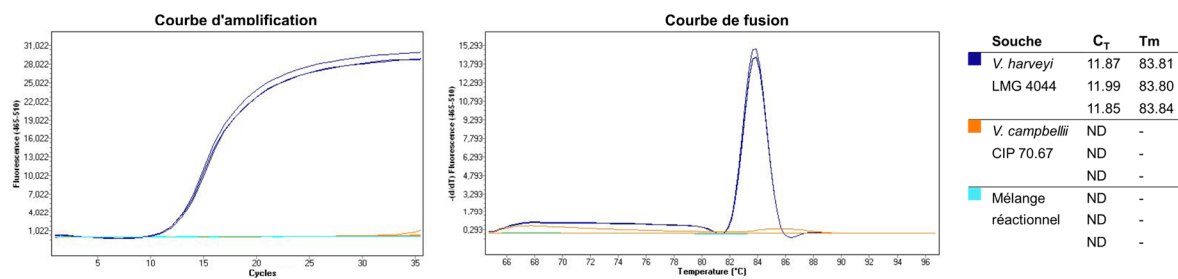
Les travaux d'optimisation de la PCR en temps réel avec le couple 2 (mreB11F/mreB9bisR) ont d'abord porté sur le kit de pré-mix utilisé puis sur la température d'hybridation.

2.3.1. Sélection du kit de pré-mix

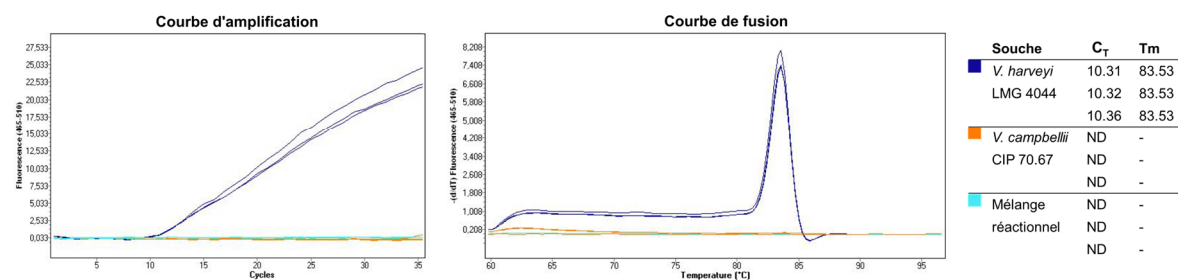
Après échanges avec différents fournisseurs, trois pré-mix ont été sélectionnés : (i) le Master Mix LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics), (ii) le QuantiNova SYBR Green PCR Kit (Qiagen) et (iii) le TaKaRa SYBR Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) (Ozyme). Pour chaque kit, une PCR en temps réel a été réalisée selon les préconisations des fournisseurs. Chaque essai comprenait un témoin positif (*V. harveyi* LMG 4044), un témoin négatif (*V. campbellii* CIP 70.67) et un contrôle composé du mélange réactionnel seul. Les essais ont été réalisés avec une température d'hybridation de 60 °C, en triplicatas pour chaque échantillon. Les résultats sont présentés dans la Figure 21.

Le pré-mix Ozyme a d'abord été éliminé puisque deux des triplicatas correspondant au témoin positif n'ont pas été détectés par l'appareil. Bien qu'une courbe d'amplification soit affichée et qu'un pic de fusion soit détecté, l'appareil considère ces deux échantillons comme négatifs et ne renvoie pas de C_T . Ces résultats, répétables d'un essai à l'autre, n'ont pas pu être expliqués malgré plusieurs échanges avec les fournisseurs et les fabricants de l'appareil. Enfin, le choix entre le kit pré-mix Roche Diagnostics et Qiagen a été fait selon l'allure des courbes d'amplification obtenues. L'allure de la courbe d'amplification obtenue à partir du kit Qiagen témoigne d'une saturation de la fluorescence détectée par l'appareil. Celui-ci a donc été éliminé et le kit Roche diagnostics a ainsi été sélectionné pour les optimisations suivantes.

Roche Diagnostics : Master Mix LightCycler® 480 SYBR Green I Master



Qiagen : QuantiNova SYBR Green PCR Kit



Ozyme : TaKaRa SYBR Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)

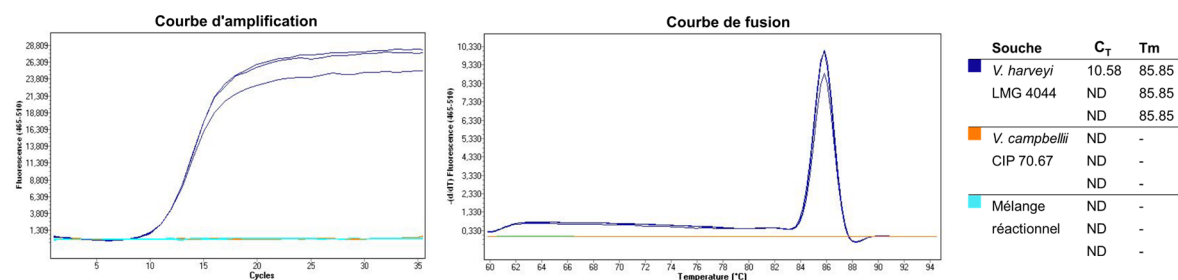


Figure 21 : Courbes d'amplification et courbes de fusion obtenues à partir de 3 kits de pré-mix différents.

2.3.2. Sélection de la température d'hybridation

Dans un premier temps, une gamme de températures d'hybridation de 55 °C à 65 °C a été réalisée par PCR conventionnelle à l'aide d'un iCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) en utilisant le kit Platinum™ Green Hot Start PCR Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) selon les recommandations des fabricants. Chaque essai a été réalisé en triplicatas et comprenait un témoin positif (*V. harveyi* LMG 4044), un témoin négatif (*V. campbellii* CIP 70.67) et un contrôle composé du mélange réactionnel seul. Le gel d'électrophorèse obtenu est présenté dans la Figure 22.

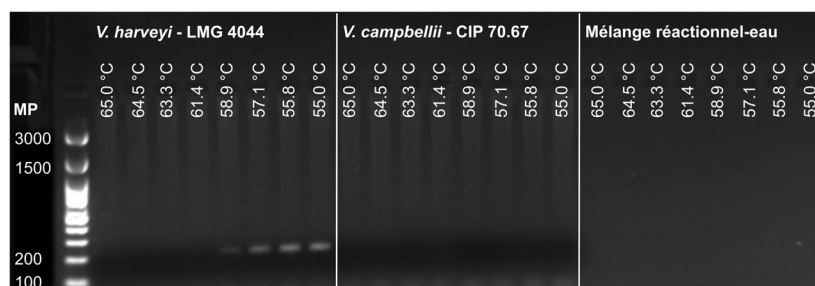


Figure 22 : Gel d'électrophorèse obtenu suite à la réalisation d'une gamme de températures d'hybridation allant de 55 °C à 65 °C.

A l'issue de cette PCR conventionnelle, 4 bandes d'amplification spécifiques (215 pb) sont observées sur le gel d'électrophorèse pour des températures comprises entre 55 °C et 58.9 °C. Deux PCR en temps réel ont ensuite été réalisées selon les précédents paramètres optimisés avec deux températures d'hybridation différentes 55 °C et 57 °C. Pour une même concentration d'ADN, les valeurs de C_T obtenues à 55 °C étaient inférieures (en moyenne -0,79 C_T) aux valeurs obtenues à 57 °C. Ainsi, pour la suite des expérimentations, la température d'hybridation retenue a été de 55 °C.

3. Adaptation au traitement d'échantillons environnementaux

L'objectif était de pouvoir adapter la PCR en temps réel, mise au point pour l'étude de la dynamique de *V. harveyi* en milieu aquacole, à la fois dans l'eau et les biofilms. Il a ainsi fallu sélectionner la méthode d'échantillonnage pour ces deux types d'échantillons, ainsi que la méthode de collecte des bactéries. Plusieurs tests préliminaires ont ainsi été réalisés.

3.1. Echantillons d'eau

Il existe plusieurs méthodes pour traiter des échantillons d'eau. Certains auteurs optent pour le prélèvement d'un petit volume (1 mL), directement suivi d'une analyse (Zhou *et al.*, 2007). D'autres préconisent une étape de centrifugation ou de filtration, permettant de concentrer les bactéries (Staley *et al.*, 2015). La filtration a l'avantage de permettre la concentration et le

traitement d'un plus grand volume d'eau et donc de fournir une meilleure représentativité de la communauté bactérienne. Ainsi, dans cette étude, des volumes de 1 L d'eau ont été prélevés. Les bactéries ont été collectées par filtration sur filtres de pores de 0,45 μm de diamètre. Les filtres de pores 0,22 μm n'ont pas été retenus puisque l'abondance de matière organique dans les bassins entraînait une saturation rapide de ces filtres.

Deux méthodes communément utilisées pour décrocher et récupérer les bactéries : le vortex (Staley *et al.*, 2015) et la sonication (Wolffs *et al.*, 2006), ont été testées. Brièvement, la souche de collection *V. harveyi* LMG 4044 a été inoculée dans du milieu LBS liquide et incubée 24 h à 37 °C. Deux lavages successifs ont été réalisés par centrifugation ($5000 \times g$, 10 min) et le culot a été repris dans de l'eau physiologique stérile, afin d'éliminer toute trace du milieu de culture. Des volumes de 250 mL de suspension bactérienne ont ensuite été préparés dans de l'eau de mer stérile, par ajustement de la DO_{490} . Deux concentrations ont été testées : 10^4 UFC.mL^{-1} et 10^2 UFC.mL^{-1} . Ces suspensions ont ensuite été filtrées sur filtre de pore 0,45 μm (Sartorius, Göttingen, Germany). Les filtres ont ensuite été déposés dans un volume de 25 mL d'eau physiologique et les bactéries ont été décrochées selon différents protocoles : la sonication (45 kHz) pendant 1 min, 5 min ou 10 min ou le vortex pendant 1 min, 3 min ou 5 min. Les filtres ont ensuite été retirés et les solutions bactériennes ont été centrifugées. Le surnageant a été éliminé et le culot a été repris dans 2 mL d'eau physiologique. Des ensemencements ont été réalisés sur milieu LBS agar à l'aide d'un enseigneur spirale (easySpiral®, Interscience, St-Nom-la-Bretèche, France) et les colonies ont été dénombrées à l'aide d'un Scan 500 (Interscience). Enfin, la concentration bactérienne récupérée suite à ces différents traitements a été déterminée. Les résultats sont présentés dans la Figure 23.

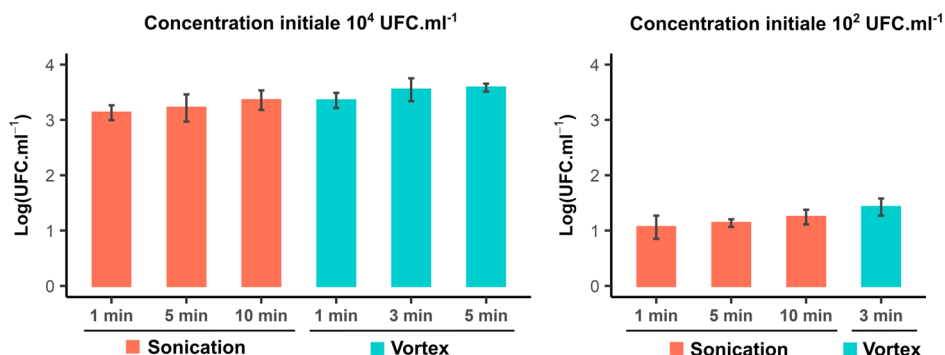


Figure 23 : Concentration de *V. harveyi* LMG 4044 récupérée en fonction des différents temps de sonication et de vortex testés. Deux concentrations initiales ont été testées 10⁴ UFC.mL⁻¹ et 10² UFC.mL⁻¹. Les histogrammes représentent la moyenne de 3 répliquats et les barres d'erreurs représentent l'écart type.

D'après ces résultats, le maximum de bactéries a été récupéré grâce au vortex. Les quantités de bactéries récupérées au temps de vortex 3 min et 5 min étant très proches, pour des raisons pratiques, le temps de vortex de 3 min a été sélectionné pour la suite des expérimentations.

3.2. Echantillons de biofilms

En milieu aquacole, la présence de poissons dans les bassins tout au long de l'année rend le prélèvement de biofilms complexe. Les bassins ne pouvant pas être régulièrement vidés, les biofilms formés sur les parois sont difficilement accessibles. Il a fallu trouver une solution adaptée à la situation. Ainsi, dans cette étude, des morceaux de béton en forme de palets, ont été confectionnés par les employés d'Aquanord-Ichthus, avec les mêmes matériaux que ceux utilisés pour la confection de la paroi des bassins. Un dispositif a ensuite été mis au point pour maintenir les morceaux de béton à 20 cm en dessous de la surface de l'eau, les rendant facilement accessibles. Une fois immergés dans les bassins, les biofilms formés sur ces morceaux sont considérés comme similaires à ceux formés sur la paroi des bassins. Ce dispositif permet non seulement de faciliter l'échantillonnage, mais également de suivre l'évolution du biofilm dès le début de la colonisation (Fig. 24).

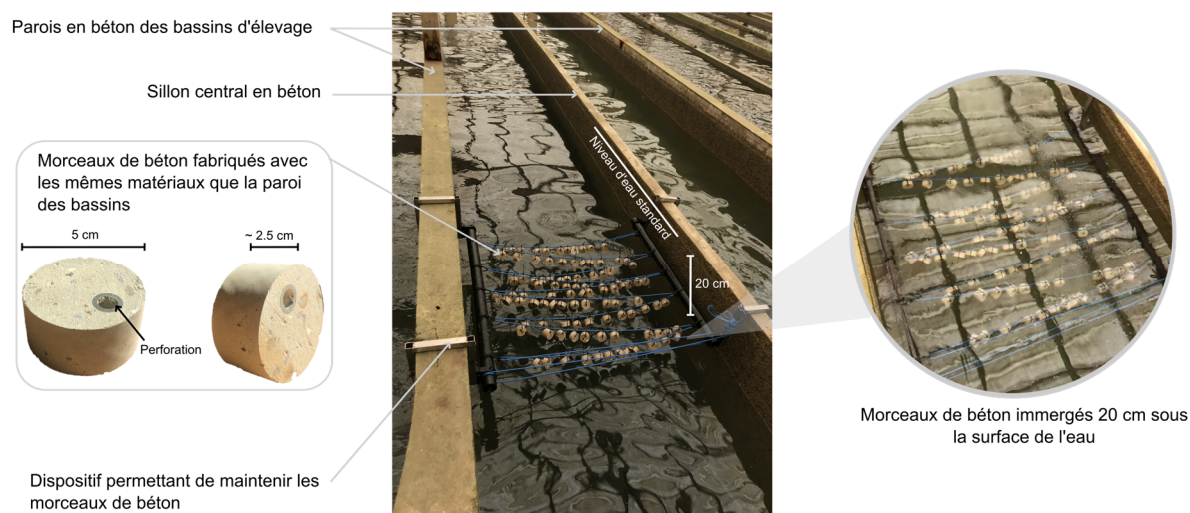


Figure 24 : Photographies des morceaux de béton et du dispositif permettant de les maintenir immergés 20 cm sous la surface de l'eau dans les bassins aquacoles contenant des bars communs d'élevage.

La méthode retenue pour décrocher et collecter les bactéries formant des biofilms sur les morceaux de béton consiste en l'écouvillonnage d'une surface donnée (De Muynck *et al.*, 2010). Bien que tous les morceaux de béton avaient un diamètre de 5 cm, il n'était pas envisageable d'écouvillonner toute leur surface. En effet, il existait un risque que les morceaux de béton se dégradent au cours du temps, réduisant leur diamètre et donc la surface d'écouvillonnage, ce qui aurait pu entraîner un biais dans les mesures. Ainsi, des gabarits en acier inoxydable ont été confectionnés avec une perforation de 2,34 cm². Seule cette surface était ainsi écouvillonnée à l'aide de deux écouvillons comme décrit par Mougín *et al.* (2019). Les bactéries sont ensuite décrochées des écouvillons par vortex pendant 3 min (Fig. 25).



Figure 25 : Photographies du gabarit, permettant d'écouvillonner une surface définie, et d'un morceau de béton avant et après écouvillonnage de la surface.

4. Validation et application de la PCR en temps réel : Article 1

Statut de l'article Publié dans *Aquaculture* (IF : 3,224) : [Mougin et al. \(2020a\)](#)

Objectif de l'étude L'objectif était de développer une PCR en temps réel, permettant de quantifier spécifiquement l'espèce *V. harveyi* dans des échantillons d'eau de mer et de biofilms.

Résultats principaux La spécificité des 3 paires d'amorces ciblant les gènes *toxR*, *topA* et *mreB*, a été déterminée grâce à un panel de 85 souches de collection et d'isolats d'origines variées, dont certaines isolées à partir de rates de poissons moribonds provenant d'Aquanord-Ichtus. Les 3 paires d'amorces ont démontré une bonne exclusivité. En revanche, plusieurs résultats faux négatifs ont révélé une diversité génétique des gènes *toxR* et *topA* au sein de l'espèce *V. harveyi* et une bonne conservation des séquences du gène *mreB*. La PCR en temps réel a donc été développée en utilisant les amorces ciblant le gène *mreB*, avec une limite de quantification et de détection de 5 copies de génome par réaction. Afin d'adapter cette PCR au traitement des échantillons environnementaux, 5 kits d'extraction d'ADN ont été testés. Parmi ceux-ci, le kit DNeasy PowerBiofilm (Qiagen) a permis d'obtenir l'ADN le plus pur ainsi qu'un meilleur rendement à la fois pour les échantillons d'eau et de biofilms. Enfin, la présence d'inhibiteurs de PCR a été vérifiée.

Conclusion La PCR en temps réel ciblant le gène *mreB* présentée dans cet article, permet de quantifier l'espèce *V. harveyi* directement dans des échantillons d'eau et de biofilms.

Article 1

Development of a *mreB*-targeted real-time PCR method for the quantitative detection of *Vibrio harveyi* in seawater and biofilm from aquaculture systems

Received 3 March 2020; Received in revised form 21 March 2020; Accepted 6 April 2020 Available online 8 April 2020

Julia Mougin¹, Roxane Roquigny¹, Marie-Agnès Travers^{2,3}, Thierry Grard¹, Maryse Bonnin-Jusserand¹ and Cédric Le Bris¹

¹ Univ. Littoral Côte d'Opale, UMR 1158 BioEcoAgro, TERRA Viollette, USC Anses, INRAe, Univ. Lille, Univ. Artois, Univ. Picardie Jules Verne, Univ. Liège, Yncréa, F-62200 Boulogne-sur-Mer, France

² Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins, SG2M-LGPMM, Ifremer, F-17390 La Tremblade, France

³ IHPE, Université de Montpellier, CNRS, Ifremer, Université de Perpignan Via Domitia. F-34090 Montpellier, France

Keywords: *Vibrio harveyi*, quantitative detection, *mreB* gene, seawater, biofilm, aquaculture

Abstract

Vibrio harveyi is a particularly problematic Gram-negative bacterium because it can form biofilms on aquaculture facility surfaces, leading to resistance of bacteria against antibiotics and water sanitizers. A SYBR Green I quantitative real-time PCR method was developed to detect *V. harveyi* directly from environmental samples, including seawater and biofilm. Specific primers targeting the *mreB* gene were designed. The exclusivity and inclusivity of the newly designed primers were evaluated using a panel of 85 bacteria: 58 *V. harveyi* from multiples origins and 27

non-*V. harveyi* isolates, and compared with two pairs of primers targeting the *topA* and *toxR* genes that were designed previously. All sets of primers were able to distinguish *V. harveyi* from closely related species belonging to the Harveyi clade. However, the *mreB* primers showed better inclusivity and were thus used to develop the real-time PCR assay. A quantification curve was obtained from pure culture of *V. harveyi* and exhibited excellent efficacy with detection levels as low as 5 genome copies in the PCR reaction. After selection of the extraction kit allowing the best DNA quantity and purity, validation was performed on both seawater and biofilm samples collected from a fish farm. The presence of inhibitors in the DNA templates was evaluated and a 10-fold dilution of template DNA was recommended in order to avoid their effects. The assay was able to detect *V. harveyi* from environmental samples, confirming the validity of the method. This real-time PCR method will help to evaluate the dynamics of *V. harveyi* in aquaculture facilities. Suitable prophylactic control measures could be designed using this method, instead of the use of curative methods such as antibiotics.

1. Introduction

Vibrio are Gram-negative bacteria ubiquitous in aquatic environments (Farmer *et al.*, 2005). Some of them, such as *Vibrio harveyi*, are known to be the causative agents of vibriosis, a fatal hemorrhagic septicemia disease affecting aquatic animals (Austin *et al.*, 2006). Vibriosis caused by *V. harveyi* is a major concern in aquaculture. More particularly, this species is a well-known pathogen of shrimps, mollusks and crustaceans (Sawabe *et al.*, 2007b, Travers *et al.*, 2008, Soto-Rodriguez *et al.*, 2012). Infections have also been reported in fishes such as seabass, *Dicentrarchus labrax* (Pujalte *et al.*, 2003). Recently, Vendramin *et al.* (2016) identified *V. harveyi* as an emerging problem in reared seabass, an economically important fish species in Europe (FAO 2005-2020). Importantly, Bourne *et al.* (2006) highlighted that biofilms on rearing tanks may act as potential reservoirs for *V. harveyi*. Biofilms of *V. harveyi* are even more dangerous to reared animals given that they can enhance the resistance of bacteria to antibiotics or water sanitizers (Karunasagar *et al.*, 1996, Thompson *et al.*, 2004a). This phenomenon leads

to persistence of *V. harveyi* in aquaculture tanks. Early diagnosis and monitoring of *V. harveyi* prevalence are therefore major concerns in seabass farming systems.

Conventional culture-based and biochemical methods for the detection and identification of *V. harveyi* are unreliable, laborious, and time-consuming (Bonnin-Jusserand *et al.*, 2017). On the contrary, polymerase chain reaction (PCR)-based methods offer a rapid, reliable, and more specific analysis (Cano-Gomez *et al.*, 2009). A number of conventional PCR methods have already been reported for the detection of *V. harveyi* in farming systems (Conejero et Hedreyda, 2003, Oakey *et al.*, 2003, Pang *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2014b). However, to our knowledge, only two studies have described real-time PCR methods for the quantification of *V. harveyi* in seawater coming from an abalone farm (Fukui et Sawabe, 2008, Schikorski *et al.*, 2013). These studies did not process complex samples such as biofilms, and did not include a wide range of environmental isolates or several closely *V. harveyi*-related species belonging to the Harveyi clade. They also stated that improvements in their protocols remain to be made in order to increase the sensitivity of their methods. Furthermore, Fukui et Sawabe (2008) highlighted the lack of specificity of their designed oligonucleotides, leading to an unreliable estimation of the amount of *V. harveyi* in seawater. Identification of reliable target genes of *V. harveyi* remains difficult due to genome similarity between species belonging to the Harveyi clade (Gomez-Gil *et al.*, 2004). The standard target 16S rRNA gene, commonly used, is not suitable to distinguish these species from one another. For instance, *V. harveyi*, *V. campbellii*, and *V. rotiferianus* share more than 99% sequence similarity in the 16S rRNA gene (Gomez-Gil *et al.*, 2003, Gomez-Gil *et al.*, 2004). Cano-Gomez *et al.* (2011) performed a multilocus sequence analysis (MLSA) based on the 16S rRNA, *mreB*, *ftsZ*, *pyrH*, *rpoA* and *topA* genes, and results showed that the concatenation of both the *mreB* and *topA* loci was sufficiently accurate to differentiate between *V. harveyi*-related species. Therefore, using only the *mreB* (rod shape-determining gene, subunit B) or *topA* (topoisomerase I) gene could potentially enable discrimination by PCR. In addition, Pascual *et al.* (2010) performed an MLSA study based on the 16S rRNA, *gyrB*, *pyrH*, *rctB*, *recA*, *rpoD* and *toxR* genes. They suggested that the individual *toxR* (transmembrane transcription regulator) gene has high discriminatory power and could be suitable to differentiate between

V. harveyi-related species. Oligonucleotides targeting the *topA* and *toxR* genes have already been designed (Pang *et al.*, 2006, Cano-Gomez *et al.*, 2015). Their specificity still needs to be clarified since the studies did not include a wide range of environmental isolates or several closely *V. harveyi*-related species. However, no oligonucleotide targeting the *mreB* gene of *V. harveyi* has been described so far.

This study reports the development of a specific SYBR Green I real-time PCR method for the detection and quantification of *V. harveyi* in both seawater and biofilm samples from aquaculture tanks. The optimized method provides a common protocol to extract *V. harveyi* DNA from both of these complex environmental samples, while minimizing the impact of PCR inhibitors. The specificity of the previous *topA* and *toxR* and the newly designed *mreB* oligonucleotides was assessed. Thereafter, in view of the results obtained, the real-time PCR protocol was established and optimized using the *mreB* target gene. Finally, the detection and quantification of indigenous *V. harveyi* in seawater and biofilm from a fish farm were performed.

2. Materials and methods

2.1. Bacteria strains and culture methods

A total of 85 *Vibrio* strains were used in this study (Table 1): (i) 38 collection strains were obtained from the Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM/LMG), the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ), the Spanish Type Culture Collection (CECT), and the Collection of Institut Pasteur (CIP), (ii) 35 isolates were obtained from a fish farm raising seabass *Dicentrarchus labrax*. Bacteria were isolated from the spleen of moribund fish, plated on marine agar (MA), (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), incubated at 25 °C overnight and then identified by matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry (MALDI TOF MS) using the Bruker Biotyper database by a veterinary laboratory, and (iii) 12 isolates were isolated by the French Research Institute for the Exploitation of the Sea (IFREMER) from oysters (*Crassostrea gigas*) and abalone (*Haliotis tuberculata*). All bacteria were maintained in Luria-Bertani broth supplemented with

20% NaCl (LBS), with a final pH of 7.2 ± 0.2 , and with 20% glycerol and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. Bacteria were plated on thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) and incubated overnight at growth temperature, in order to check the purity of the isolates. A single colony was then plated on LBS agar and incubated overnight at growth temperature. This temperature was $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, except for LMG 11216^T, LMG 25266^T, Vh2, Vh3, Vt1, Vt2 and Vg1, for which the growth temperature was $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Table 1. List of collection strains and bacterial isolates used in this study

Strain/isolate ID	Assigned species	Host/Origin	Isolation	
			Place	Date
LMG 4044 ^T	<i>Vibrio harveyi</i>	Dead amphipod (<i>Talorchestia</i> sp.)	United States	/
LMG 7890	<i>Vibrio harveyi</i>	Brown shark (<i>Carcharhinus plumbeus</i>) kidney	United States	/
LMG 23680	<i>Vibrio harveyi</i>	Seawater	Japan	2005
LMG 19643	<i>Vibrio harveyi</i>	Japanese horse mackerel (<i>Trachurus japonicus</i>)	Japan	2002
LMG 23442	<i>Vibrio harveyi</i>	Dead abalone	Japan	2002
LMG 18299	<i>Vibrio harveyi</i>	Seabream (<i>Sparus aurata</i>)	Spain	1990
LMG 11755	<i>Vibrio harveyi</i>	Shark, mouth	Bahamas	/
LMG 22894	<i>Vibrio harveyi</i>	Shrimp, hemolymph	Mexico	1995
LMG 16832	<i>Vibrio harveyi</i>	Black tiger prawn	Thailand	/
LMG 22895	<i>Vibrio harveyi</i>	Shrimp, hepatopancreas	Mexico	1999
LMG 23678	<i>Vibrio harveyi</i>	Breeding seawater	Japan	2004
LMG 11226	<i>Vibrio harveyi</i>	/	/	/
LMG 23688	<i>Vibrio harveyi</i>	Abalone, internal organ	Japan	/
LMG 10946 ^a	<i>Vibrio harveyi</i> ^a	Prawn (<i>Palaemon indicus</i>)	/	/
LMG 10947 ^a	<i>Vibrio harveyi</i> ^a	Seawater	Red Sea	/
LMG 11216 ^T	<i>Vibrio campbellii</i>	Seawater (800 meters)	Hawaii	/
LMG 21363	<i>Vibrio campbellii</i>	Diseased <i>Penaeus monodon</i> juvenile	Philippines	/
LMG 11256	<i>Vibrio campbellii</i>	Seawater	Hawaii	/
CIP 70.67	<i>Vibrio campbellii</i>	/	/	/
LMG 16862	<i>Vibrio campbellii</i>	Oyster	Spain	1989
LMG 16863	<i>Vibrio campbellii</i>	Oyster	Spain	1989
DSMZ 23055 ^T	<i>Vibrio owensii</i>	Spiny lobster (<i>Panulirus ornatus</i>) Aquaculture	Australia	
LMG 25430 ^T	<i>Vibrio owensii</i>	<i>Mussismilia hispida</i>	Brazil	/
LMG 20370	<i>Vibrio owensii</i>	White shrimp (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	Ecuador	/
LMG 4043	<i>Vibrio owensii</i>	Seawater	Israel	/
LMG 11659	<i>Vibrio owensii</i>	Seawater	Hawaii	/
LMG 21456	<i>Vibrio rotiferianus</i>	Rotifer (<i>Brachionus plicatilis</i>) culture	Belgium	/
DSMZ 17186 ^T	<i>Vibrio rotiferianus</i>	Rotifer (<i>Brachionus plicatilis</i>) culture	Belgium	/
LMG 2850 ^T	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Human, "Shirashu" food poisoning	Japan	/
LMG 16838	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Penaeus orientalis</i>	China	/
LMG 11650	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Seawater	/	/
LMG 4409 ^T	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Spoiled horse mackerel (<i>Trachurus trachurus</i>) causing food poisoning	Japan	/
LMG 10950	<i>Vibrio natriegens</i>	Oyster	United States	/
CECT 526 ^T	<i>Vibrio natriegens</i>	Salt marsh mud	United States	

Strain/isolate ID	Assigned species	Host/Origin	Isolation	
			Place	Date
LMG 25266 ^T	<i>Vibrio azureus</i>	Seawater	Japan	
CECT 8524	<i>Vibrio jasicida</i>	<i>Lutjanus guttatus</i>	Mexico	2004
DSMZ 19137 ^T	<i>Vibrio mytili</i>	<i>Mytilus edulis</i>	Spain	2007
CECT 7298 ^T	<i>Vibrio sinaloensis</i>	<i>Lutjanus guttatus</i>	Mexico	2003
Vh1 to Vh33 (Vh27 and Vh30 do not exist)	<i>Vibrio harveyi</i>	Sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i>) spleen, fish farm	France	2017
Vh34 and Vh35	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Haliotis tuberculata</i> , juvenile, hatchery (Manche)	France	2004
Vh36	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Haliotis tuberculata</i> , adult, hatchery (Manche)	France	2004
Vh37	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Haliotis tuberculata</i> , adult (Fermanville)	France	2005
Vh38	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Haliotis tuberculata</i> , adult (Omonville)	France	2005
Vh43	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>C. gigas</i> , spat (Arcachon)	France	2007
Vh45	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>C. gigas</i> , juvenile (Thau)	France	2007
Vh47 and Vh48	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Haliotis tuberculata</i> , juvenile (Aber Wrac'h)	France	2014
Vh51	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>C. gigas</i>	France	2007
Vh52 and Vh53	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>C. gigas</i> , larva, hatchery (Vendée)	France	2008
Vt1 and Vt2	<i>Vibrio tasmaniensis</i>	Sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i>) spleen, fish farm	France	2017
Vg1	<i>Vibrio gigantis</i>	Sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i>) spleen, fish farm	France	2017
Vp1	<i>Vibrio rotiferianus</i>	Sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i>) spleen, fish farm	France	2017

^a LMG 10946 and LMG 10947 strains were initially identified as *Vibrio harveyi* species but our study revealed misidentification

^T Type strain

2.2. Isolation of bacteria from seawater samples

Seawater volumes of 1 L from aquaculture tanks were collected 20 cm below the water surface. Samples were maintained on ice during transport to the laboratory and processed within 2 h. They were filtered through 0.45 µm-pore-size nitrocellulose filters (Sartorius, Göttingen, Germany). If the samples contained many aggregates and filters clogged, several filters were used. They were then immersed in 25 mL of LBS with 20% glycerol and stored at -80 °C until analysis. Subsequently, samples were defrosted at ambient temperature and vortexed for 3 min in order to free bacteria from filters. Filters were removed and the liquid was centrifuged at 8000×*g* for 10 min. The cell pellet was resuspended in 25 mL of physiological water (0.9% NaCl) and

centrifuged at $8000\times g$ for 10 min. Supernatant was removed and DNA was extracted from cell pellets.

2.3. Isolation of bacteria from biofilm samples

Pieces of concrete ($5\text{ cm} \times 2.5\text{ cm}$) were made with the same materials as the walls of aquaculture tanks and immersed 20 cm below the water surface in these tanks. The objective was to mimic the biofilm formation occurring on the walls of aquaculture tanks, on pieces of concrete that can easily be retrieved. The concrete pieces, still immersed in seawater, were maintained on ice during transport to the laboratory and processed within 2 h. Bacteria from biofilm were collected by swabbing 2.34 cm^2 of concrete surface using a sterile stainless-steel jig. The procedure used to remove biofilm from concrete has previously been described by Mougín *et al.* (2019), and was modified slightly. Briefly, two swabs (150C, Copan, Brescia, Italy) were used twice for each piece of concrete and immersed into 3 mL of LBS with 20% glycerol. The tube containing the two swabs was then stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. Subsequently, samples were defrosted at ambient temperature and vortexed for 3 min in order to free bacteria from swabs. Swabs were removed and the liquid was centrifuged at $8000\times g$ for 10 min. The cell pellet was resuspended in 3 mL of physiological water (0.9% NaCl) and centrifuged at $8000\times g$ for 10 min. Supernatant was removed and DNA was extracted from cell pellets.

2.4. DNA extraction

DNA templates were extracted from pure culture, isolated from LBS agar, using the DNeasy Blood&Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) and an automated nucleic acid extractor QIAcube Connect (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. The final elution volume was 100 μL . The extracted DNA was then stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use.

In order to prepare DNA templates from environmental samples, five DNA extraction kits were tested: the DNeasy PowerWater kit (no. 1), the DNeasy PowerBiofilm kit (no. 2), the DNeasy Blood&Tissue kit (no. 3) (Qiagen, Hilden, Germany), the Extracta DNA Prep for PCR-Tissue kit (no. 4) (Quantabio, Beverly, MA, USA), and the Arcis DNA Sample Prep kit (no. 5) (Arcis

Biotechnology, Daresbury, United Kingdom). For each kit, the protocol was carried out according to the manufacturer's instructions. Extracted DNA was resuspended in a final volume of 100 μ L and stored at -20 °C.

2.5. Design of primers, specificity, and annealing temperature

Three *V. harveyi*-specific pairs of primers were tested in this study (Table 2): two pairs of primers targeting the *topA* and *toxR* genes (Pascual *et al.*, 2010, Cano-Gomez *et al.*, 2015), and one newly designed pair of primers targeting the *mreB* gene (Table 2).

In order to design the *mreB* primers, two alignments were performed. The first alignment allowed the identification of conserved regions shared by *V. harveyi* strains: 69 *mreB* gene sequences of *V. harveyi*, obtained from the GenBank database (National Center for Biotechnology Information, NCBI), were aligned using Mega X software version 10.0.1 (supplemental data, appendix A). The second alignment allowed the identification of divergent regions between *V. harveyi* and *V. harveyi*-related species: 9 *mreB* gene sequences of *V. harveyi*-related species were aligned with one *mreB* gene sequence of *V. harveyi* using MultAlin (Corpet, 1988) (supplemental data, appendix B). The target sequence was chosen from the conserved region of *V. harveyi* and the divergent region between *V. harveyi* and *V. harveyi*-related species. *In silico* analyses for melting temperature (T_m) estimation, secondary structures, and potential dimer formation of *mreB*, *topA* and *toxR* were performed using Oligo Calculator version 3.27 (Kibbe, 2007) and Primer3Plus (Rozen *et Skaletsky*, 2000).

The annealing temperatures (T_a) of all sets of primers were optimized using a temperature gradient ranging from 55 °C to 65 °C with the iCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) (data not shown).

The *in silico* specificity of the primers was verified using the nucleotide BLAST search program with the GenBank database (NCBI). The experimental specificity was evaluated using conventional PCR. Exclusivity and inclusivity tests were performed in triplicate with a panel of

V. harveyi (n=58) and non-*V. harveyi* organisms (n=27) (Table 1). Exclusivity was validated by a lack of PCR products, and inclusivity was validated by a single band and expected product sizes on gel electrophoresis.

All primers were synthesized by TIB MOLBIOL (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Germany) and were suspended in nuclease-free water to reach a final concentration of 10 μ M and stored at -20 °C.

Table 2. Nucleotide sequences and characteristics of primers used for conventional and real-time PCR amplification

Gene	Target organism	Primer name	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature (Ta)	Product length (bp)	Reference
<i>mreB</i>	<i>V. harveyi</i>	mreB11F mreB9bisR	TGAAGCTGTGATCAACTACG CCTGACAGTGGCTCTTGTA	55 °C	215	/
<i>topA</i>	<i>V. harveyi</i>	Vh.topA-F Vh.topA-R	TGGCGCAGCGTCTATACG TATTTGTCAACCGAAGTCTCAGAACC	55 °C	121	(Cano-Gomez <i>et al.</i> , 2015)
<i>toxR</i>	<i>V. harveyi</i>	toxRF1 toxRR1	GAAGCAGCACTCACCGAT GGTGAAGACTCATCAGCA	55 °C	382	(Pang <i>et al.</i> , 2006)
<i>ftsZ</i>	<i>Vibrio</i> spp.	VftsZ75F VftsZ800R	GCTGTTGAACACATGGTACG GCACCAGCAAGATCGATATC	50 °C	750	(Sawabe <i>et al.</i> , 2007a)
<i>recA</i>	<i>Vibrio</i> spp.	VrecA130F VrecA720R	GTCTACCAATGGGTCGTATC GCCATTGTAGCTGTACCAAG	50 °C	600	(Sawabe <i>et al.</i> , 2007a)
<i>gyrB</i>	<i>Vibrio</i> spp.	gyrB 1 gyrB 2	AGCCAAACNAAAGAYAARYT CGYARYTTRTCYGGRTTRTRYTC	55 °C	493	(Teh <i>et al.</i> , 2010)
16S rRNA	<i>Vibrio</i> spp.	567F 680R	GGCGTAAAGCGCATGCAGGT GAAATTCTACCCCCCTCTACAG	60 °C	113	(Thompson <i>et al.</i> , 2004b)
16S rRNA V4V5	High coverage of bacteria and archaea	515FY 926R	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA CCGYCAATTYMTTTRAGTTT	50 °C	411	(Quince <i>et al.</i> , 2011, Parada <i>et al.</i> , 2016)

2.6. Conventional PCR conditions

The PCR reaction mixture contained 2.5 μL of 10X PCR buffer, 0.5 μL of 10 mM dNTP, 0.5 μL of each primer (10 μM), 0.125 μL of 5 units. μL^{-1} HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen, Hilden, Germany), 2 μL of template DNA (equilibrated to 25 ng. μL^{-1}), and 18.875 μL of nuclease-free water to a final volume of 25 μL . The PCR reaction was run on a Thermal Cycler (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA), under the following conditions: 5 min at 94 °C, followed by 30 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at the optimized T_a , and 1 min at 72 °C. The final cycle was followed by an additional 7 min of extension at 72 °C. All PCR experiments were carried out in triplicate and contained a positive control (LMG 4044 *V. harveyi* DNA), a negative control (CIP 70.67 *V. campbellii* DNA), and a no template control (NTC), DNA-free. The size of the PCR product was verified by ethidium bromide agarose gel electrophoresis (2%).

2.7. Real-time PCR conditions

The reaction mixture contained 10 μL of 2X Master Mix LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics, France), 1 μL of each *mreB* primer (10 μM), 5 μL of template DNA, and 3 μL of water to a final volume of 20 μL . The quantitative PCR reaction was run on a LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, France), under the following conditions: 5 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 10 s at 95 °C, 20 s at 55 °C, and 10 s at 72 °C. The melting curve analysis was then performed under the following conditions: 5 s at 95 °C, 1 min at 65 °C, and an increase of the temperature from 65 °C to 97 °C at 0.3 °C. s^{-1} . All quantitative PCR experiments were performed in triplicate and included a positive control (LMG 4044 *V. harveyi* DNA), a negative control (CIP 70.67 *V. campbellii* DNA), and a no template control (NTC), DNA-free. Lack of specific amplification was defined for C_T values ≥ 35 . The baseline of PCR was automatically set by the system, and data analysis was carried out with LightCycler® 480 SW 1.5.1 software.

2.8. Sequencing conditions

PCR amplification products were generated for three pairs of primers targeting the *ftsZ* (cell division protein FtsZ gene), *recA* (recombination and DNA repair protein gene) and *gyrB*

(uridylylate kinase gene) genes (Table 2), screened from the literature (Sawabe *et al.*, 2007a, Teh *et al.*, 2010). The PCR reaction mixture contained 25 μL of 2X Platinum™ Green Hot Start PCR Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 μL of each primer (10 μM), 5 μL of template DNA (equilibrated to 25 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), and 18 μL of nuclease-free water to a final volume of 50 μL . The PCR reaction was run on a Thermal Cycler (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA), under the following conditions: 5 min at 95 °C, followed by 30 cycles of 1 min at 95 °C, 2 min 15 s at the optimized T_a , and 1 min 15 s at 72 °C. The final cycle was followed by an additional 7 min of extension at 72 °C. The PCR products of expected size were then sequenced from both sides (forward and reverse), using Sanger sequencing by GenoScreen (Lille, France). Analysis was performed using the nucleotide BLAST search program with the GenBank database (NCBI). For whole-genome sequencing, organisms were sent to GenoScreen on LBS agar after incubation at growth temperature. Analysis was performed with CLC Genomics Workbench version 20.0.2. Raw sequences were paired and trimmed using default parameters and then assembled into contigs using the default parameters of the Genome Finishing Module. A distance tree was generated using the neighbor joining algorithm, with these contigs and different genome sequences of *Vibrio* spp. available on NCBI.

2.9. Real-time PCR validation

For the sensitivity of the DNA detection assay, pure *V. harveyi* DNA was extracted and serially diluted in nuclease-free water. The purity and the quantity of the extracted DNA were determined using a DeNovix DS-11 spectrophotometer (Clinisciences, Nanterre, France) and a Qubit 3.0 fluorometer (dsDNA high-sensitivity assay), (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), respectively. The number of genome copies was estimated from the DNA quantity measured, considering the genome size of *V. harveyi* equal to 5.67×10^6 bp (Brankatschk *et al.*, 2012, Urbanczyk *et al.*, 2013b). The calibration curve was plotted using the means of C_T values of 20 replicate series versus the logarithm of each dilution factor.

The presence of PCR inhibitors in the extracted DNA templates was verified by adding an amount of 125 ng of pure *V. harveyi* DNA into template DNA obtained from 3 different seawater

and 3 different biofilm samples, in order to reach a final concentration of 10^6 genome copies per reaction. A 10-fold dilution series of inoculated DNA template and pure DNA, prepared in nuclease-free water, were then amplified by real-time PCR.

In order to verify whether the assay enabled detection and quantification of indigenous *V. harveyi* from environmental samples, real-time analysis of 4 seawater and 4 biofilm samples collected from a fish farm was performed. Genome copy equivalent (GE) concentrations were estimated by standard curve, taking into account the dilution factor of the assay.

3. Results

3.1. Specificity of the real-time PCR assay

First, the exclusivity of the *mreB*, *topA* and *toxR* primers was confirmed by performing conventional PCR on a panel of 23 non-*V. harveyi* collection strains including, at least one reference strain for each of the 10 species, and 4 non-*V. harveyi* (Table 1). These organisms were mostly species in the Harveyi clade, genetically close to *V. harveyi*. Second, the inclusivity of the three pairs of primers was determined by testing a panel of 15 *V. harveyi* collection strains, including the reference strain LMG 4044^T. Then, 43 *V. harveyi* isolates obtained from reared seabass (n=31), abalone (*H. tuberculata*) (n=7), and oyster (*C. gigas*) (n=5) were tested. Among these 58 organisms, only 53, 52 and 48 showed positive results for the *mreB*, *topA* and *toxR* primers, respectively (Table 3.A). In fact, for all the primers, no PCR product was detected from the LMG 10946 and LMG 10947 collection strains and from the Vh2, Vh15 and Vh28 isolates. Moreover, the results diverged between the *mreB*, *topA* and *toxR* primers for 5 isolates. PCR products were detected from Vh5, Vh8, Vh22 and Vh29 isolates using the *mreB* and *topA* primers, while no PCR product was detected using the *toxR* primers. PCR products were detected from the Vh25 isolate using the *mreB* primers, while no PCR product was detected using the *topA* and *toxR* primers. As misidentifications could have occurred, identification of these 10 organisms required confirmation.

In order to clearly identify these 10 organisms (LMG 10946, LMG 10947, Vh2, Vh5, Vh8, Vh15, Vh22, Vh25, Vh28 and Vh29), Sanger sequencing was performed targeting three reference genes: *ftsZ*, *recA*, and *gyrB*. The non-*V. harveyi* isolates Vt1, Vt2, Vg1 and Vp1 were also sequenced. When the sequencing results were divergent between the three genes, whole-genome sequencing was performed. Analysis of Vh5, Vh8, Vh22, Vh25 and Vh29 sequences showed high identity to *V. harveyi* (supplemental data, appendix C). However, LMG 10946, LMG 10947, Vh2, Vh15, Vh28, Vt1, Vt2, Vg1 and Vp1 sequences exhibited high identity to non-*V. harveyi* species (supplemental data, appendix C and D). PCR results obtained with the *mreB* primers fitted with these data, whereas those obtained with *topA* and *toxR* did not (Table 3.B).

Ultimately, the *mreB*, *topA* and *toxR* primers exhibited 100%, 98.1% and 90.6% inclusivity, respectively. The lack of PCR product detected from all the non-*V. harveyi* strains ($n = 27$) revealed 100% exclusivity for all primers.

The specificity of the *mreB* primers was confirmed by sequencing PCR products obtained from the LMG 4044^T reference strain. Moreover, analysis of the melting curve, obtained from real-time PCR experiments, highlighted only one peak with a melting temperature (T_m) of 83.70 ± 0.10 °C (data not shown). Detection of PCR products using 16S rRNA primers from all tested strains confirmed that DNA extraction was properly performed. The inclusion of blank samples with no template DNA confirmed non-specific reactions between the components.

Table 3. Specificity of the *mreB*, *topA* and *toxR* primers according to collection strains and bacterial isolates used in the present study. A. PCR results of the 85 organisms studied. B. Detail of the PCR and sequencing results of the 10 *V. harveyi* strains that showed divergence with initially assigned species identification

A.

Species	Number of strains	PCR results			
		215 bp <i>mreB</i>	121 bp <i>topA</i>	382 bp <i>toxR</i>	113 bp 16S rRNA
<i>V. harveyi</i>	58	+(53)	+(52)	+(48)	+(58)
<i>V. campbellii</i>	6	-	-	-	+(6)
<i>V. owensii</i>	5	-	-	-	+(5)
<i>V. rotiferianus</i>	3	-	-	-	+(3)
<i>V. parahaemolyticus</i>	2	-	-	-	+(2)
<i>V. alginolyticus</i>	2	-	-	-	+(2)
<i>V. natriegens</i>	2	-	-	-	+(2)
<i>V. azureus</i>	1	-	-	-	+(1)
<i>V. jasicida</i>	1	-	-	-	+(1)
<i>V. mytili</i>	1	-	-	-	+(1)
<i>V. sinaloensis</i>	1	-	-	-	+(1)
<i>V. tasmaniensis</i>	2	-	-	-	+(2)
<i>V. gigantis</i>	1	-	-	-	+(1)

B.

Assigned species	Strain/ isolate ID	Sequencing identification results				
<i>V. harveyi</i>	LMG 10946	<i>V. campbellii</i>	-	-	-	+
<i>V. harveyi</i>	LMG 10947	<i>V. owensii</i>	-	-	-	+
<i>V. harveyi</i>	Vh2	<i>V. jasicida</i>	-	-	-	+
<i>V. harveyi</i>	Vh5	<i>V. harveyi</i>	+	+	-	+
<i>V. harveyi</i>	Vh8	<i>V. harveyi</i>	+	+	-	+
<i>V. harveyi</i>	Vh15	<i>V. rotiferianus</i>	-	-	-	+
<i>V. harveyi</i>	Vh22	<i>V. harveyi</i>	+	+	-	+
<i>V. harveyi</i>	Vh25	<i>V. harveyi</i>	+	-	-	+
<i>V. harveyi</i>	Vh28	<i>V. owensii</i>	-	-	-	+
<i>V. harveyi</i>	Vh29	<i>V. harveyi</i>	+	+	-	+

‘+’ Positive, ‘-’ Negative

3.2. Sensitivity and quantification limits of the assay

Assay sensitivity was determined using 10 independent dilution series of purified LMG 4044^T *V. harveyi* DNA, ranging from 2, 5, and 10 to 10⁷ genome copies per reaction, in duplicate. The lowest number of genome copies detected in at least 95% of the 20 replicates was 5 genome copies per reaction, corresponding to the limit of detection (LOD) for pure DNA of *V. harveyi*.

The linear regression showed accurate correlation ($R=0.9907$) between the logarithm of genome copies per reaction and the threshold cycle (C_T) value (Fig. 1). The correlation was linear over a range of 5 to 10^7 genome copies per reaction, confirming that the limit of quantification (LOQ) corresponded to 5 genome copies per reaction. Real-time PCR efficiency was calculated from the slope of the linear portion of the calibration curve, according to the formula: $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$ and was equal to 99.9%.

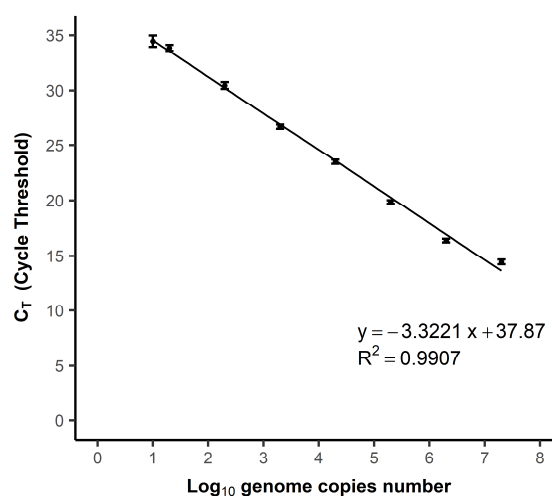


Figure 1. Standard curve representing the detection and quantification of *V. harveyi* DNA by real-time PCR targeting the *mreB* gene. Means of 20 replicates are represented with corresponding standard deviation

3.3. Quantitative detection of *V. harveyi* in environmental samples

In order to obtain DNA templates with optimal quantity and purity from both seawater and biofilm samples, five extraction kits were compared (Table 4). To check the integrity of extracted DNA and the potential presence of PCR inhibitors, two conventional PCRs were carried out. The first targeted the 16S rRNA V4V5 hypervariable region found in most bacteria and archaea, and the second targeted 16S rRNA found in most *Vibrio* species. Both PCR analyses indicated the potential presence of PCR inhibitors when using no. 3 and no. 1 kits. In fact, no PCR product was detected from seawater and biofilm DNA templates extracted with the no. 3 kit. PCR products were only detected from seawater DNA templates extracted with the no. 1 kit using 16S rRNA V4V5 primers. These results highlighted that the no. 3 kit was not suitable for DNA

extraction from either of our samples, and the no. 1 kit was not suitable for DNA extraction from biofilm samples. The seawater and biofilm DNA templates extracted with no. 4 and no. 5 kits were cloudy solutions. That is why the PCR analyses were not carried out and the two kits were not selected. PCR products were detected from seawater and biofilm extracted DNA templates with the no. 2 kit, using both primers. Moreover, the highest quantity of extracted DNA was obtained with the no. 2 kit. These results indicated that the no. 2 kit – DNeasy PowerBiofilm kit (Qiagen) – is suitable for the extraction of *Vibrio* DNA from both our environmental samples and was therefore selected.

Table 4. Comparison of the DNA extraction methods for both matrices seawater and biofilm samples. Values are the means of two independent replicates.

No.	DNA extraction kit	Matrix	Qubit	DeNovix		PCR		
			DNA ng· μ L ⁻¹	DNA ng· μ L ⁻¹	OD 260/230	OD 260/280	16S rRNA V4V5 All bacteria	16S rRNA <i>Vibrio</i> spp.
1	DNeasy PowerWater kit Qiagen	Seawater	3.73	10.65	0.54	1.10	+	-
		Biofilm	2.82	6.87	0.34	0.67	-	-
2	DNeasy PowerBiofilm kit Qiagen	Seawater	10.56	17.75	0.80	1.45	+	+
		Biofilm	6.15	8.90	0.24	1.07	+	+
3	DNeasy Blood&Tissue kit Qiagen	Seawater	2.07	11.04	0.51	2.18	-	-
		Biofilm	2.73	8.25	0.87	1.49	-	-
4	Extracta DNA Prep for PCR-Tissue kit Quantabio	Seawater	Too low	231.75	0.59	1.35		
		Biofilm	Too low	242.04	0.59	1.63		
5	Arcis DNA Sample Prep kit Arcis Biotechnology	Seawater	3.74	208.07	0.14	0.68		
		Biofilm	3.85	216.88	0.14	0.69		

OD, optic density

Even though this chosen kit seemed to reduce the amount of co-extracted inhibitors, some of them could still subsist in the environmental extracted DNA templates. This is why the effect of these inhibitors was evaluated. A known amount of pure *V. harveyi* DNA was added to 3 different

seawater and 3 different biofilm DNA templates. These DNA templates were extracted with the no. 2 kit, and previously identified as negative for the target gene. A series of 10-fold dilutions, ranging from 10^2 to 10^6 genome copies per reaction of pure DNA template, was prepared and used as a standard. Series of 10-fold dilutions (10^2 to 10^6 genome copies per reaction) of inoculated seawater and biofilm DNA templates were then prepared and amplified by real-time PCR. The results showed a significant increase in the C_T value for the less diluted seawater and biofilm DNA templates (10^6) compared to the C_T value of pure DNA (Fig. 2). The data obtained confirmed that seawater and biofilm samples contained inhibitors affecting assay efficiency. Nevertheless, the results indicated that the effect of inhibitors was avoided by 10-fold dilution since no increase in C_T value was observed for the 10-fold diluted DNA template (10^2 to 10^5). Therefore, the DNA templates extracted from both samples must be 10-fold diluted in order to avoid the influence of real-time PCR inhibitors.

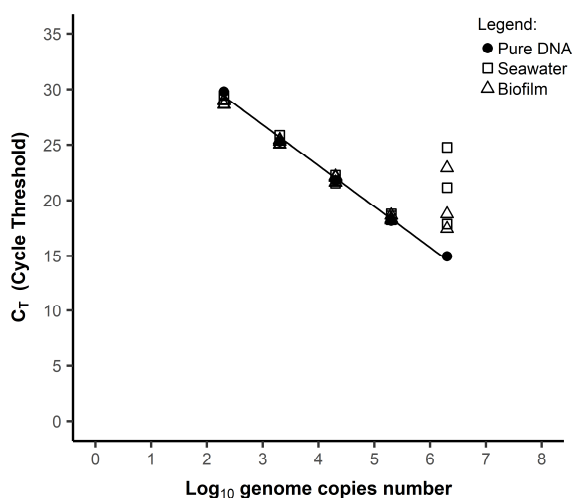


Figure 2. Plot of 10-fold dilution series representing the detection and quantification of *V. harveyi* DNA by real-time PCR from pure culture of *V. harveyi* and from inoculated seawater and biofilm DNA templates

The real-time PCR assay was validated by detecting and quantifying indigenous *V. harveyi* by real-time PCR from 4 seawater and 4 biofilm samples, collected from a seabass farm. The results showed specific amplification from both seawater and biofilm samples (Table 5). However, a negative result was obtained from one biofilm sample, meaning that the quantity of *V. harveyi*

was below the limit of detection of the assay. The concentration of indigenous *V. harveyi* ranged from 1.23 to 2.68×10^2 GE.mL⁻¹ in seawater, and from 2.84×10^2 to 5.00×10^3 GE.cm⁻² in biofilm samples.

Table 5. Quantification of *V. harveyi* from seawater and biofilm samples collected from a seabass farm

Date	Sample	Estimated quantity in samples
May 3, 2018	Seawater	5.82×10^1 GE.mL ⁻¹
	Biofilm	ND
Jul. 11, 2018	Seawater	2.10×10^2 GE.mL ⁻¹
	Biofilm	1.04×10^3 GE.cm ⁻²
Aug. 22, 2018	Seawater	2.68×10^2 GE.mL ⁻¹
	Biofilm	5.00×10^3 GE.cm ⁻²
Oct. 17, 2018	Seawater	1.23×10^0 GE.mL ⁻¹
	Biofilm	2.84×10^2 GE.cm ⁻²

ND, not detected

GE, genome equivalent

4. Discussion

As *Vibrio harveyi* is a major pathogen in aquaculture, its early detection and quantification are a key focus for aquaculture farms. Development of reliable identification tools is complex since species belonging to the Harveyi clade are genetically and phenotypically similar. Whole-genome and fingerprinting techniques exhibited high discriminatory power. Nevertheless, these later are expensive, time-consuming and thus not suitable to provide a rapid diagnosis in a context of vibriosis outbreaks (Cano-Gomez *et al.*, 2009). On the contrary, real-time PCR is a rapid and reliable method that is commonly used. Previous studies have highlighted the need for more *V. harveyi*-specific primers and accurate detection sensitivity in order to prevent vibriosis in aquaculture facilities (Fukui *et al.*, 2008, Schikorski *et al.*, 2013).

In this work, a *V. harveyi*-specific quantitative real-time PCR was developed. The fluorescent reporter SYBR Green I was used since it has the advantage of not involving the design of an oligonucleotide probe. The protocol was established with a newly designed pair of primers targeting the *mreB* gene, which is a single-copy gene that is stable in the genome (Cano-Gomez *et al.*, 2011). The present real-time PCR allowed for discrimination between *V. harveyi* and

closely related species belonging to the Harveyi clade, such as *V. alginolyticus*, *V. azureus*, *V. campbellii*, *V. jasicida*, *V. mytili*, *V. natriegens*, *V. owensii* (synonym of *V. communis*), *V. parahaemolyticus*, and *V. rotiferianus* (Sawabe *et al.*, 2007a, Hoffmann *et al.*, 2012, Urbanczyk *et al.*, 2013b).

Additional information was found regarding the exclusivity and inclusivity of the *topA* and *toxR* primers previously designed by Cano-Gomez *et al.* (2015) and Pang *et al.* (2006), respectively. The lack of inclusivity of both sets of primers suggested sequence heterogeneities in the *topA* and *toxR* genes of epidemiologically distinct strains within *V. harveyi* species. Importantly, *Vibrio* species are known for high genomic plasticity (Rowe-Magnus *et al.*, 2006). This is consistent with the study carried out by Conejero et Hedreyda (2003), who developed a *V. harveyi*-specific conventional PCR targeting the *toxR* gene. The validation experiments revealed false-negative results for two *V. harveyi* isolates: STD 3-101 and VIB 391. Both these organisms were isolated from shrimps while other organisms that showed positive results were isolated from fishes. This shows that the high genomic plasticity of *V. harveyi* can lead to false-negative results. Nevertheless, in the present study, the *mreB* gene appeared relatively well conserved since no false-negative results were recorded for our isolates.

Discriminating between species belonging to the Harveyi clade is complex and misidentifications can occur. Our results showed that the *V. harveyi*-LMG 10946 and LMG 10947 collection strains have previously been identified incorrectly. According to our data, LMG 10946 was identified as *V. campbellii* and LMG 10947 as *V. owensii*. Thompson *et al.* (2001) had studied both strains, among others, using fluorescent amplified fragment length polymorphism (FAFLP) genotyping. The strains were distributed in the same cluster as the LMG 4043 and LMG 11659 collection strains identified as *V. owensii*. Therefore, these results indicated genome similarities with non-*V. harveyi* species, suggesting potential misidentification. Furthermore, Hoffmann *et al.* (2012) reported previous incorrect identifications for several collection strains, by performing an MLSA study based on the *ftsZ*, *mreB*, *rctB*, *rpoD*, *topA* and *toxR* genes. They confirmed that strains LMG 16862 and LMG 16863, first identified as *V. harveyi*, were actually *V. campbellii*, and LMG

4043 was *V. owensii*. They also demonstrated that *V. communis* and *V. owensii* are synonyms. In our study, negative PCR results were obtained using the *mreB*, *topA* and *toxR* primers for all the collection strains previously mentioned, confirming the accurate exclusivity of all sets of primers.

The present study clearly demonstrates the complexities of processing environmental samples from aquaculture systems. Our method was optimized to quantify the population of indigenous *V. harveyi* in complex environmental samples: seawater and biofilm from aquaculture. Detection of target DNA in tanks was even more problematic due to the high diversity and abundance of organic matter. The challenge was to provide accurate DNA yield, while preserving DNA quality. Filtration is a common method used to process aquatic samples (Staley *et al.*, 2015). This method makes it possible to concentrate bacteria and thereby increase DNA yield, without previous enrichment steps, which can be time-consuming (Akkermans *et al.*, 1995). Likewise, swabbing has been widely used to collect environmental biofilm samples from concrete (De Muyneck *et al.*, 2010). However, environmental samples often contain various PCR-inhibitors leading to false-negative results or inaccurate quantification (Wilson, 1997). That is why our study reports the DNA extraction efficiency for five distinct DNA extractions kits. We found that the DNA extraction kit allowing the best DNA yield and purity was the DNeasy PowerBiofilm kit (Qiagen), which was therefore selected to perform the assay. Nevertheless, this optimization was not sufficient and a few inhibitors remained in extracted template DNA. The effects of these inhibitors can be avoided by a simple widely used method, which consists in diluting template DNA of environmental samples (Wilson, 1997). However, the target DNA is also diluted, and this strategy reduces detection sensitivity. The real-time PCR detection limit for *V. harveyi* derived from pure culture was 5 genome copies per PCR reaction. Although complex environmental matrices can affect sensitivity, the assay detection limit for environmental samples could not be determined due to background *V. harveyi* levels in seawater and biofilm samples. However, performing this assay in aquaculture systems did enable the detection and quantification of indigenous *V. harveyi* in unseeded samples. The present method is therefore applicable in aquaculture facilities.

The concentration of indigenous *V. harveyi* detected in seawater samples ranged from 1 to 10^2 GE.mL⁻¹. Higher bacteria abundances were obtained in the study carried out by Zhou *et al.* (2007). They quantified the abundance of *V. alginolyticus* in environmental seawater by real-time PCR. The concentration ranged from 10^2 to 10^3 CFU.mL⁻¹. Likewise, Saulnier *et al.* (2009) quantified the abundance of *V. aestuarianus* in seawater by real-time PCR. The concentrations found ranged from 10^1 to 10^2 cells.mL⁻¹. The volume of the treated sample could explain this difference. Importantly, in these previous studies, volumes of 1 mL or less of seawater were analyzed by real-time PCR, while in the present study, 1 L of seawater was first concentrated and then analyzed. In this way, the concentration of bacteria by filtration allowed us to improve the detection limit. Nevertheless, the concentration of large volumes of water can lead to a significant loss of the target organism during the filtration procedure (Akkermans *et al.*, 1995, Fukui *et al.*, 2008). The concentration of indigenous *V. harveyi* detected in biofilm samples ranged from 10^1 to 10^3 GE.cm⁻². This value makes sense when compared to the findings reported by Shikuma *et al.* (2010). They quantified the abundance of *V. cholerae* in seawater and biofilm samples isolated from harbors by real-time PCR. High abundance of *V. cholerae* was detected and the concentration obtained was around 10^3 GE.cm⁻². They also highlighted that the concentration in seawater samples was lower than in biofilm, and was approximately 10^1 GE.mL⁻¹. Thus, our method allows for accurate quantification of bacteria in environmental samples.

5. Conclusion

To conclude, the present method is a useful molecular tool, allowing for direct quantification of *V. harveyi* in seawater and biofilm samples from aquaculture. The *mreB* primers designed showed high specificity for *V. harveyi* strains isolated from various organisms, achieving discrimination between *V. harveyi* and closely related species belonging to the Harveyi clade. This tool will be used in a forthcoming study with the aim of monitoring seasonal changes in *V. harveyi* abundance in aquaculture facilities.

Funding

Julia Mougín would like to thank the Hauts-de-France regional council and ULCO for their financial support of her PhD studies. This work was funded by the French government, Ifremer and the region Hauts-de-France in the framework of the CPER 2014-2020 MARCO project. This work was also supported by a grant from FEAMP (PFEA470017FA1000006) as part of the LUVIBAR project.

Acknowledgements

The authors thank Aquanord-Ictus as a contributor to the LUVIBAR project and especially Guillaume Tielie, Anabelle Duhamel and Céline Doyen. The authors are also grateful to Thomas Brauge and Stéphanie Copin for their scientific assistance. The authors thank the National Reference Laboratory for mollusk diseases for sharing *V. harveyi* strains, and the French ministry DGAL founding the NRL. Finally, the authors thank the veterinary laboratory LABOCEA for sharing *V. harveyi* strains isolated from Aquanord-Ictus.

References

- Akkermans, A.D., Van Elsas, J.D., and De Bruijn, F.J. (1995). *Molecular microbial ecology manual*. Springer. I.S.B.N.: 978-94-009-0215-2
- Austin, B., and Zhang, X.H. (2006). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett. Appl. Microbiol.* 43(2), 119-124. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01989.x.
- Bonnin-Jusserand, M., Copin, S., Le Bris, C., Brauge, T., Gay, M., Brisabois, A., et al. (2017). *Vibrio* species involved in seafood-borne outbreaks (*Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*): Review of microbiological versus recent molecular detection methods in seafood products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 59(4), 597-610. doi: 10.1080/10408398.2017.1384715
- Bourne, D.G., Høj, L., Webster, N.S., Swan, J., and Hall, M.R. (2006). Biofilm development within a larval rearing tank of the tropical rock lobster, *Panulirus ornatus*. *Aquaculture* 260(1-4), 27-38. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.06.023.
- Brankatschk, R., Bodenhausen, N., Zeyer, J., and Bürgmann, H. (2012). Simple absolute quantification method correcting for quantitative PCR efficiency variations for microbial community samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(12), 4481-4489. doi: 10.1128/AEM.07878-11.
- Cano-Gomez, A., Bourne, D.G., Hall, M.R., Owens, L., and Høj, L. (2009). Molecular identification, typing and tracking of *Vibrio harveyi* in aquaculture systems: current methods and future prospects. *Aquaculture* 287(1-2), 1-10. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.10.058.
- Cano-Gomez, A., Høj, L., Owens, L., and Andreakis, N. (2011). Multilocus sequence analysis provides basis for fast and reliable identification of *Vibrio harveyi*-related species and reveals previous misidentification of important marine pathogens. *Syst. Appl. Microbiol.* 34(8), 561-565. doi: 10.1016/j.syapm.2011.09.001.
- Cano-Gomez, A., Høj, L., Owens, L., Baillie, B.K., and Andreakis, N. (2015). A multiplex PCR-based

- protocol for identification and quantification of *Vibrio harveyi*-related species. *Aquaculture* 437, 195-200. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.10.050.
- Conejero, M., and Hedreyda, C. (2003). Isolation of partial *toxR* gene of *Vibrio harveyi* and design of *toxR*-targeted PCR primers for species detection. *J. Appl. Microbiol.* 95(3), 602-611. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02020.x.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16(22), 10881-10890. doi: 10.1093/nar/16.22.10881.
- De Muynck, W., De Belie, N., and Verstraete, W. (2010). Antimicrobial mortar surfaces for the improvement of hygienic conditions. *J. Appl. Microbiol.* 108(1), 62-72. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04395.x.
- FAO 2005-2020 National Aquaculture Sector Overview. Vue générale du secteur aquacole national - France. Texte par Lacroix, D. Département des pêches et de l'aquaculture de la FAO.
- Farmer, J. 3rd., Michael Janda, J., Brenner, F.W., Cameron, D.N., and Birkhead, K.M. (2005). "*Vibrio* Pacini 1854, 411^{AL}" in *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, ed. K.N. Brenner DJ, Staley JT, Garrity GM. John Wiley & Sons, Inc., in association with *Bergey's Manual Trust*. 494-546.
- Fukui, Y., and Sawabe, T. (2008). Rapid detection of *Vibrio harveyi* in seawater by real-time PCR. *Microbes Environ.* 23(2), 172-176. doi: 10.1264/jsme2.23.173.
- Gomez-Gil, B., Soto-Rodríguez, S., García-Gasca, A., Roque, A., Vazquez-Juarez, R., Thompson, F.L., et al. (2004). Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology* 150(6), 1769-1777. doi: 10.1099/mic.0.26797-0
- Gomez-Gil, B., Thompson, F., Thompson, C., and Swings, J. (2003). *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53(1), 239-243. doi: 10.1099/ij.s.0.02430-0.
- Hoffmann, M., Monday, S., Fischer, M., and Brown, E. (2012). Genetic and phylogenetic evidence for misidentification of *Vibrio* species within the Harveyi clade. *Lett. Appl. Microbiol.* 54(2), 160-165. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03183.x.
- Karunasagar, I., Ota, S., and Karunasagar, I. (1996). Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces. *Aquaculture* 140(3), 241-245. doi: 10.1016/0044-8486(95)01180-3.
- Kibbe, W.A. (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* 35(suppl_2), W43-W46. doi: 10.1093/nar/gkm234.
- Kim, M.S., Cho, J.Y., and Choi, H.S. (2014). Identification of *Vibrio harveyi*, *Vibrio ichthyoenteri*, and *Photobacterium damsela* isolated from olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea by multiplex PCR developed using the *rpoB* gene. *Fish. Sci.* 80(2), 333-339. doi: 10.1007/s12562-014-0702-5.
- Mougin, J., Copin, S., Bojolly, D., Ragueneau, V., Robert-Pillot, A., Quilici, M.-L., et al. (2019). Adhesion to stainless steel surfaces and detection of viable but non cultivable cells of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* isolated from shrimps in seafood processing environments: *Stayin' alive?* *Food Control* 102, 122-130. doi: 10.1016/j.foodcont.2019.03.024.
- Oakey, H., Levy, N., Bourne, D., Cullen, B., and Thomas, A. (2003). The use of PCR to aid in the rapid identification of *Vibrio harveyi* isolates. *J. Appl. Microbiol.* 95(6), 1293-1303. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02128.x.
- Pang, L., Zhang, X.H., Zhong, Y., Chen, J., Li, Y., and Austin, B. (2006). Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the *toxR* gene. *Lett. Appl. Microbiol.* 43(3), 249-255. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01962.x.
- Parada, A.E., Needham, D.M., and Fuhrman, J.A. (2016). Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ. Microbiol.* 18(5), 1403-1414. doi: 10.1111/1462-2920.13023.
- Pascual, J., Macián, M.C., Arahall, D.R., Garay, E., and Pujalte, M.J. (2010). Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *retB* and *toxR* genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60(1), 154-165. doi: 10.1099/ij.s.0.010702-0
- Pujalte, M., Sitjà-Bobadilla, A., Macián, M., Belloch, C., Alvarez-Pellitero, P., Pérez-Sánchez, J., et al. (2003). Virulence and molecular typing of *Vibrio harveyi* strains isolated from cultured dentex, gilthead sea bream and European sea bass. *Syst. Appl. Microbiol.* 26(2), 284-292. doi: 10.1078/072320203322346146.
- Quince, C., Lanzen, A., Davenport, R.J., and Turnbaugh, P.J. (2011). Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC Bioinf.* 12(1), 38. doi: 10.1186/1471-2105-12-38.
- Rowe-Magnus, D.A., Zouine, M., and Mazel, D. (2006). "The adaptive genetic arsenal of pathogenic *Vibrio* species: the role of integrons," in *The biology of*

- vibrios, eds. Thompson, F., Austin, B., & Swings, J., *American Society of Microbiology*, 95-111.
- Rozen, S., and Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics methods and protocols: Methods in Molecular Biology*, 365-386. doi: 10.1385/1-59259-192-2:365.
- Saulnier, D., De Decker, S., and Haffner, P. (2009). Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: a useful tool for epidemiologic studies. *J. Microbiol. Methods* 77(2), 191-197. doi: 10.1016/j.mimet.2009.01.021.
- Sawabe, T., Kita-Tsukamoto, K., and Thompson, F.L. (2007a). Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis. *J. Bacteriol.* 189(21), 7932-7936. doi: 10.1128/JB.00693-07.
- Sawabe, T., Inoue, S., Fukui, Y., Yoshie, K., Nishihara, Y., and Miura, H. (2007b). Mass mortality of Japanese abalone *Haliotis discus hannai* caused by *Vibrio harveyi* infection. *Microbes Environ.* 22(3), 300-308. doi: 10.1264/jsme2.22.300.
- Schikorski, D., Renault, T., Paillard, C., Bidault-Toffin, A., Tourbiez, D., and Saulnier, D. (2013). Development of TaqMan real-time PCR assays for monitoring *Vibrio harveyi* infection and a plasmid harbored by virulent strains in European abalone *Haliotis tuberculata* aquaculture. *Aquaculture* 392, 106-112. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.02.005.
- Shikuma, N.J., and Hadfield, M.G. (2010). Marine biofilms on submerged surfaces are a reservoir for *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *Biofouling* 26(1), 39-46. doi: 10.1080/08927010903282814
- Soto-Rodríguez, S.A., Gomez-Gil, B., Lozano, R., del Rio-Rodríguez, R., Diéguez, A.L., and Romalde, J.L. (2012). Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the "Bright-red" Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.* 109(3), 307-317. doi: 10.1016/j.jip.2012.01.006.
- Staley, C., Gould, T.J., Wang, P., Phillips, J., Cotner, J.B., and Sadowsky, M.J. (2015). Evaluation of water sampling methodologies for amplicon-based characterization of bacterial community structure. *J. Microbiol. Methods* 114, 43-50. doi: 10.1016/j.mimet.2015.05.003.
- Teh, C., Chua, K., and Thong, K.L. (2010). Simultaneous differential detection of human pathogenic and nonpathogenic *Vibrio* species using a multiplex PCR based on *gyrB* and *pntA* genes. *J. Appl. Microbiol.* 108(6), 1940-1945. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04599.x.
- Thompson, F.L., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., and Swings, J. (2001). Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Syst. Appl. Microbiol.* 24(4), 520-538. doi: 10.1078/0723-2020-00067
- Thompson, F.L., Iida, T., and Swings, J. (2004a). Biodiversity of vibrios. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68(3), 403-431. doi: 10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004.
- Thompson, J.R., Randa, M.A., Marcelino, L.A., Tomita-Mitchell, A., Lim, E., and Polz, M.F. (2004b). Diversity and dynamics of a North Atlantic coastal *Vibrio* community. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(7), 4103-4110. doi: 10.1128/AEM.70.7.4103-4110.2004.
- Travers, M.-A., Le Goïc, N., Huchette, S., Koken, M., and Paillard, C. (2008). Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 25(6), 800-808. doi: 10.1016/j.fsi.2008.08.003.
- Urbanczyk, H., Ogura, Y., and Hayashi, T. (2013b). Taxonomic revision of *Harveyi* clade bacteria (family Vibrionaceae) based on analysis of whole genome sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63(7), 2742-2751. doi: 10.1099/ijs.0.051110-0
- Vendramin, N., Zrncic, S., Padrós, F., Oraic, D., Le Breton, A., Zarza, C., et al. (2016). Fish health in Mediterranean Aquaculture, past mistakes and future challenges. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 36(1), 38-45.
- Wilson, I.G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(10), 3741.
- Zhou, S., Hou, Z., Li, N., and Qin, Q. (2007). Development of a SYBR Green I real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio alginolyticus* in seawater and seafood. *J. Appl. Microbiol.* 103(5), 1897-1906. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03420.x.

Supplemental data

Appendix A. List of *mreB* sequences of *V. harveyi*, aligned in order to identify conserved regions shared by *V. harveyi* strains.

No.	Species	GenBank accession no.
1	<i>Vibrio harveyi</i>	JNO33881.1
2	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370163.1
3	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370156.1
4	<i>Vibrio harveyi</i>	LC071934.1
5	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370168.1
6	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370167.1
7	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370166.1
8	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370165.1
9	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370162.1
10	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370161.1
11	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370159.1
12	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370158.1
13	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370157.1
14	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370151.1
15	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370129.1
16	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370164.1
17	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370143.1
18	<i>Vibrio harveyi</i>	LC071932.1
19	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370152.1
20	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370150.1
21	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370145.1
22	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370144.1
23	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370141.1
24	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370139.1
25	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370136.1
26	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370135.1
27	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370128.1
28	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370160.1
29	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370148.1
30	<i>Vibrio harveyi</i>	LC370142.1
31	<i>Vibrio harveyi</i>	CP025537.1
32	<i>Vibrio harveyi</i>	DQ907452.1
33	<i>Vibrio harveyi</i>	JF930444.1
34	<i>Vibrio harveyi</i>	GQ428275.1
35	<i>Vibrio harveyi</i>	DQ907423.1
36	<i>Vibrio harveyi</i>	JF930449.1
37	<i>Vibrio harveyi</i>	JF930448.1
38	<i>Vibrio harveyi</i>	JF930445.1
39	<i>Vibrio harveyi</i>	JF930443.1
40	<i>Vibrio harveyi</i>	DQ907422.1
41	<i>Vibrio harveyi</i>	JF930447.1
42	<i>Vibrio harveyi</i>	GQ428272.1
43	<i>Vibrio harveyi</i>	GQ428271.1
44	<i>Vibrio harveyi</i>	GQ428270.1
45	<i>Vibrio harveyi</i>	GQ428253.1
46	<i>Vibrio harveyi</i>	GQ428258.1
47	<i>Vibrio harveyi</i>	GQ428262.1

No.	Species	GenBank accession no.
48	<i>Vibrio harveyi</i>	GQ428260.1
49	<i>Vibrio harveyi</i>	GQ428251.1
50	<i>Vibrio harveyi</i>	GQ428265.1
51	<i>Vibrio harveyi</i>	GQ428259.1
52	<i>Vibrio harveyi</i>	GQ428256.1
53	<i>Vibrio harveyi</i>	GQ428261.1
54	<i>Vibrio harveyi</i>	HQ449927.1
55	<i>Vibrio harveyi</i>	AB428991.1
56	<i>Vibrio harveyi</i>	GQ428264.1
57	<i>Vibrio harveyi</i>	HQ449929.1
58	<i>Vibrio harveyi</i>	HQ449926.1
59	<i>Vibrio harveyi</i>	HQ449925.1
60	<i>Vibrio harveyi</i>	HQ449930.1
61	<i>Vibrio harveyi</i>	HQ449929.1
62	<i>Vibrio harveyi</i>	GQ428254.1
63	<i>Vibrio harveyi</i>	GQ428250.1
64	<i>Vibrio harveyi</i>	GQ428252.1
65	<i>Vibrio harveyi</i>	HQ540725.1
66	<i>Vibrio harveyi</i>	GQ428255.1
67	<i>Vibrio harveyi</i>	GQ496611.1
68	<i>Vibrio harveyi</i>	JF930417.1
69	<i>Vibrio harveyi</i>	JF930435.1

Appendix B. List of *mreB* sequences of *V. harveyi* and *V. harveyi*-related species, aligned in order to identify divergent regions.

No.	Species	GenBank accession no.
1	<i>Vibrio harveyi</i>	JN033881.1
2	<i>Vibrio campbellii</i>	HQ449952.1
3	<i>Vibrio campbellii</i>	HQ449949.1
4	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	DQ907440.1
5	<i>Vibrio rotiferianus</i>	HQ540716.1
6	<i>Vibrio alginolyticus</i>	JQ015322.1
7	<i>Vibrio owensii</i>	HQ540729.1
8	<i>Vibrio mimicus</i>	DQ907430.1
9	<i>Vibrio natriegens</i>	JF930491.1
10	<i>Vibrio communis</i>	JF930439.1

Appendix C. Sanger sequencing results obtained from the *ftsZ*, *recA* and *gyrB* sequences after performing a BLAST analysis.

Strain/ Isolate ID	Genes								
	<i>ftsZ</i>			<i>recA</i>			<i>gyrB</i>		
	Description	% ID	e-value	Description	% ID	e-value	Description	% ID	e-value
LMG 19046	<i>V. campbellii</i>	99.84	0.0	<i>V. campbellii</i>	98.77	0.0	<i>V. campbellii</i>	96.09	0.0
LMG 19047	<i>V. owensii</i>	99.50	0.0	<i>V. rotiferianus</i>	98.92	0.0	<i>V. owensii</i>	99.62	0.0
Vh2	<i>V. jasicida</i>	99.68	0.0	<i>V. jasicida</i>	99.22	0.0	<i>V. jasicida</i>	100	0.0
Vh5	<i>V. harveyi</i>	99.85	0.0	<i>V. harveyi</i>	99.53	0.0	<i>V. harveyi</i>	99.54	0.0
Vh8	<i>V. harveyi</i>	100	0.0	<i>V. harveyi</i>	99.40	0.0	<i>V. harveyi</i>	100	0.0
Vh15	<i>V. rotiferianus</i>	99.68	0.0	<i>V. rotiferianus</i>	99.54	0.0	<i>V. rotiferianus</i>	99.38	0.0
Vh22	<i>V. harveyi</i>	100	0.0	<i>V. harveyi</i>	99.40	0.0	<i>V. harveyi</i>	100	0.0
Vh25	<i>V. harveyi</i>	100	0.0	<i>V. harveyi</i>	99.39	0.0	<i>V. harveyi</i>	99.88	0.0
Vh28	<i>V. owensii</i>	99.68	0.0	<i>V. owensii</i>	99.07	0.0	ND	ND	ND
Vh29	<i>V. harveyi</i>	100	0.0	<i>V. harveyi</i>	99.55	0.0	<i>V. harveyi</i>	99.84	0.0
Vt1	<i>V. splendidus</i>	99.84	0.0	<i>V. atlanticus</i>	100	0.0	<i>V. tasmaniensis</i>	98.00	0.0
Vt2	<i>V. splendidus</i>	99.70	0.0	<i>V. atlanticus</i>	98.45	0.0	<i>V. tasmaniensis</i>	98.36	0.0
Vg1	<i>V. gigantis</i>	99.83	0.0	ND	ND	ND	<i>V. crassostreae</i>	98.83	0.0
Vp1	<i>V. rotiferianus</i>	99.82	0.0	<i>V. rotiferianus</i>	98.60	0.0	<i>V. rotiferianus</i>	99.28	0.0

% ID, percent identity

ND, not detected (no PCR product was obtained)

Appendix D. Rooted phylogenic reconstruction based on whole genome sequences of LMG 19047 collection strain, Vt1 and Vg1 isolates and genome sequences of *Vibrio* spp. available on NCBI. Distance tree was generated with neighbor joining algorithm.

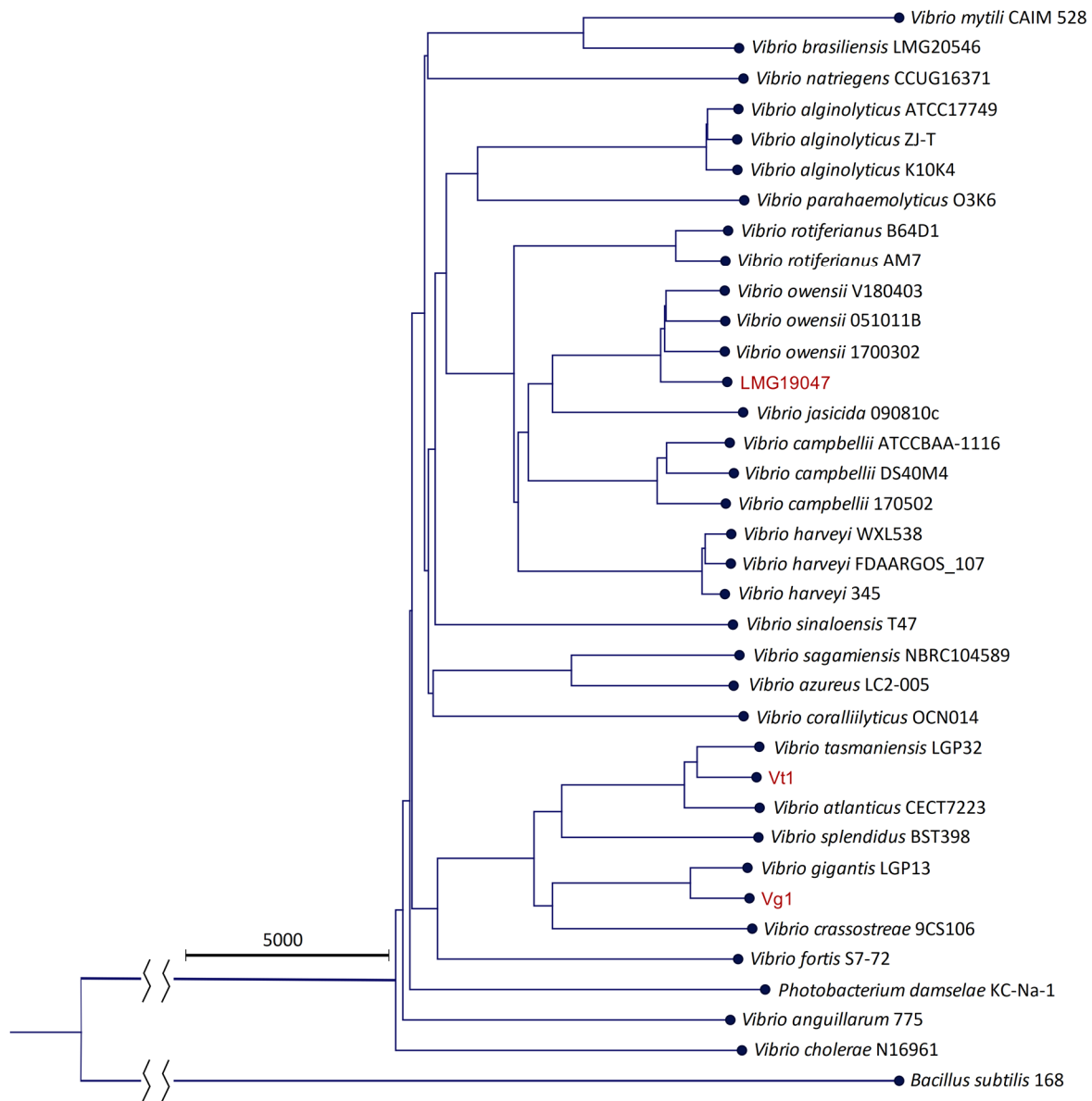
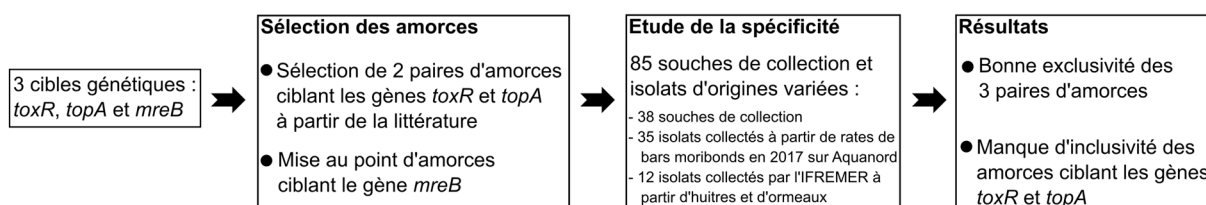


Schéma de synthèse

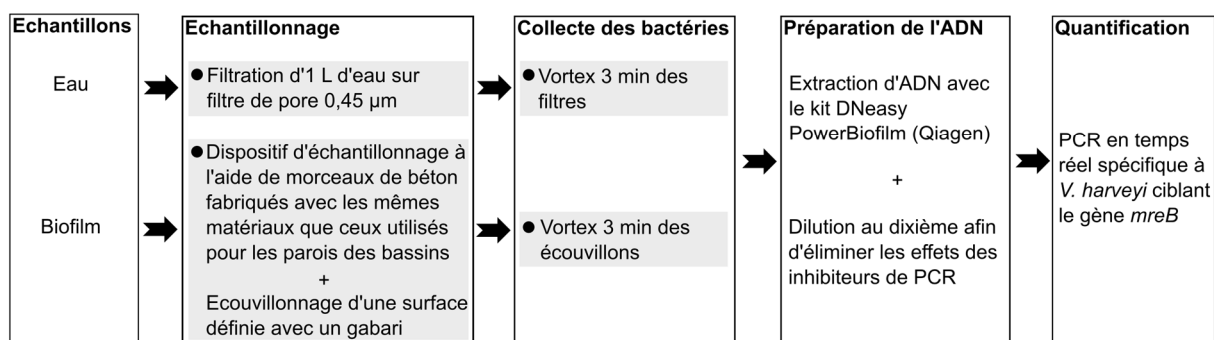
Objectif : Quantifier spécifiquement l'espèce *V. harveyi* à la fois dans des échantillons d'eau et de biofilms d'origine aquacole

1. Développement de la PCR en temps réel spécifique à *V. harveyi*



↳ Mise au point et optimisation de la PCR en temps réel en ciblant le gène *mreB*

2. Adaptation de la méthode de PCR en temps réel pour le traitement d'échantillons d'eau et de biofilms d'origine aquacole



Conclusion : La PCR en temps réel mise au point en ciblant le gène *mreB* permet de quantifier *V. harveyi* directement dans les échantillons d'eau et de biofilms d'origine aquacole. Celle-ci sera par la suite utilisée dans le **Chapitre IV** afin de suivre l'évolution spatiale et temporelle de *V. harveyi* sur Aquanord.

Figure 26 : Schéma de synthèse du Chapitre II, relatif au développement d'une PCR en temps réel pour la détection et la quantification de *Vibrio harveyi* en milieu aquacole.

Chapitre III.

Développement de la Luvibase, une base de données permettant l'identification par MALDI-TOF MS des espèces du clade Harveyi

Sommaire

1. Contexte	118
2. Utilisation de la base de données Bruker et de la VibrioBase.....	119
3. Développement et validation de la Luvibase : Article 2	122
Article 2.....	123
Abstract.....	123
1. Introduction.....	124
2. Materials and methods.....	126
3. Results.....	130
4. Discussion	138
5. Conclusion	141
References.....	143
Supplemental data.....	145
Schéma de synthèse	146

1. Contexte

À ce jour, la méthode de référence la plus couramment employée pour l'identification bactérienne est le séquençage du gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ARNr). Ce gène cible universel a l'avantage d'être présent dans le génome de toutes les bactéries, présentant des séquences hautement conservées et des séquences spécifiques à chaque espèce. Toutefois, ces séquences étant très conservées au sein de certaines espèces de *Vibrio* et notamment des espèces du clade Harveyi, cette méthode ne permet pas une identification fiable au niveau de l'espèce (Gomez-Gil *et al.*, 2004). De plus, celle-ci est coûteuse, fastidieuse et difficilement applicable au quotidien. Ainsi, pour établir un diagnostic rapide, de nombreux laboratoires vétérinaires se sont tournés vers la spectrométrie de masse de type matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight (MALDI-TOF MS). Plusieurs études ont déjà démontré la fiabilité de cette technique pour l'identification des espèces appartenant au genre *Vibrio* (Hazen *et al.*, 2009, Dieckmann *et al.*, 2010, Eddabra *et al.*, 2012, Schirmeister *et al.*, 2014, Erler *et al.*, 2015). L'analyse par MALDI-TOF MS, des protéines exprimées par les bactéries, génère des valeurs de rapports masse sur charge (m/z) spécifiques. Ces valeurs permettent de générer un spectre de masse, incluant des signaux de masse spécifiques (Clark *et al.*, 2013). L'identification repose ensuite sur la comparaison de ces spectres de masse avec les spectres enregistrés dans une base de données. Ainsi, la fiabilité de l'identification dépend fortement des spectres déposés dans la base de données. À ce jour, l'une des bases de données commerciales la plus utilisée est la base de données Bruker BioTyper, majoritairement générée pour le diagnostic clinique et manquant de spectres de souches d'origine environnementale ou aquacole. Il est toutefois possible d'élaborer des bases de données, dites sur-mesure, afin d'améliorer l'identification d'espèces d'intérêt. Par exemple, Erler *et al.* (2015) ont mis au point la VibrioBase, une base de données permettant d'améliorer l'identification d'espèces du genre *Vibrio*.

L'objectif de ce chapitre consiste à relater le développement d'une méthode permettant d'identifier les espèces du clade Harveyi, de manière fiable, par MALDI-TOF MS. Pour cela, la base de données Bruker BioTyper ainsi que la VibrioBase, mise au point par Erler *et al.* (2015),

ont d'abord été testées, afin d'identifier des isolats d'origine aquacole. Ces tests aboutissant à des erreurs d'identification, la « Luvibase », une base de données sur-mesure permettant d'identifier les espèces appartenant au clade Harveyi a été élaborée. Cette base de données a été valorisée par une publication dans la revue en *Open Access*, *Frontiers in Microbiology*, la rendant ainsi disponible pour tous (Mougin *et al.*, 2020b).

2. Utilisation de la base de données Bruker et de la VibrioBase

Dans un premier temps, les spectres de masse des 85 souches et isolats précédemment identifiés dans le *Chapitre II, Article 1* ont été acquis par MALDI-TOF MS en utilisant la technique préconisée par Bruker et détaillée dans l'*Article 2*. Les spectres obtenus ont ensuite été comparés à la base de données Bruker BioTyper ver. 9.0.0.0, puis la base de données Bruker BioTyper ver. 9.0.0.0 implémentée avec la VibrioBase (Erler *et al.*, 2015). Les résultats obtenus sont disponibles dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Comparaison entre les résultats d'identification obtenus par MALDI-TOF MS en utilisant la base de données Bruker BioTyper ver. 9.0.0.0. et les résultats obtenus en utilisant la base de données Bruker BioTyper, implémentée avec la VibrioBase. Les 85 isolats utilisés ont été précédemment identifiés dans le *Chapitre II, Article 1*. Remplissage vert = identification identique à l'espèce attribuée, remplissage rouge = identification différente de l'espèce attribuée

Souches/Isolats ID	Espèce attribuée	Identification par MALDI-TOF MS			
		Base de données Bruker		Base de données Bruker + VibrioBase	
		Identification	log-score	Identification	log-score
Souches de collection incluses dans la Luvibase (23)					
LMG 23688	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	● 1,91	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 1,91
LMG 18299	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,28	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,28
LMG 22894	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,36	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,36
LMG 22895	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,22	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,22
LMG 11755	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,33	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,36
LMG 21363	<i>V. campbellii</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	● 2,09	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,15
LMG 11256	<i>V. campbellii</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	● 2,17	<i>V. parahaemolyticus</i>	● 2,17
CIP 70.67	<i>V. campbellii</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,20	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,23
LMG 16862	<i>V. campbellii</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,22	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,23
LMG 16863	<i>V. campbellii</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,25	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,30
DSMZ 23055 ^T	<i>V. owensii</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,14	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,31
LMG 25430 ^T	<i>V. owensii</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,16	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,28
LMG 20370	<i>V. owensii</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,15	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,35
LMG 4043	<i>V. owensii</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,27	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,37
LMG 21456	<i>V. rotiferianus</i>	<i>V. rotiferianus</i>	● 2,28	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,29

Souches/Isolats ID	Espèce attribuée	Identification par MALDI-TOF MS			
		Base de données Bruker		Base de données Bruker + VibrioBase	
		Identification	log-score	Identification	log-score
LMG 2850 ^T	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	● 2,40	<i>V. parahaemolyticus</i>	● 2,54
LMG 16838	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	● 2,39	<i>V. parahaemolyticus</i>	● 2,54
LMG 11650	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	● 2,24	<i>V. alginolyticus</i>	● 2,44
LMG 4409 ^T	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	● 2,12	<i>V. alginolyticus</i>	● 2,28
LMG 10950	<i>V. natriegens</i>	<i>V. natriegens</i>	● 2,16	<i>V. natriegens</i>	● 2,19
LMG 25266 ^T	<i>V. azureus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	● 2,17	<i>V. parahaemolyticus</i>	● 2,17
CECT 8524	<i>V. jasicida</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,41	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,42
CECT 7298 ^T	<i>V. sinaloensis</i>	<i>V. brasiliensis</i>	● 1,87	<i>V. xuii</i>	● 1,88

Souches de collection incluses dans la base de données Bruker

LMG 4044 ^T	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,18	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,18
LMG 7890	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,28	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,28
LMG 19643	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,15	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,15
LMG 11216	<i>V. campbellii</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,25	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,26
DSMZ 17186 ^T	<i>V. rotiferianus</i>	<i>V. rotiferianus</i>	● 2,19	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,27
DSMZ 19137 ^T	<i>V. mytili</i>	<i>V. mytili</i>	● 2,21	<i>V. mytili</i>	● 2,21

Autres souches de collection testées

LMG 23442	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,30	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,27
LMG 16832	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,35	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,35
LMG 23678	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,36	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,36
LMG 11226	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,28	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,28
LMG 23680	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,36	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,36
LMG 10946	<i>V. campbellii</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	● 2,19	<i>V. parahaemolyticus</i>	● 2,19
LMG 10947	<i>V. owensii</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,26	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,34
LMG 11659	<i>V. owensii</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,21	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,34
CECT 526 ^T	<i>V. natriegens</i>	<i>V. natriegens</i>	● 2,27	<i>V. natriegens</i>	● 2,37

Isolats

Vh1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 43, 45, 47, 48, 51, 52, 53	<i>V. harveyi</i> (40)	<i>V. harveyi</i>	● 2,19*	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,05*
Vh2	<i>V. jasicida</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,18	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,18
Vh15	<i>V. rotiferianus</i>	<i>V. rotiferianus</i>	● 2,29	<i>V. rotiferianus</i>	● 2,29
Vh28	<i>V. owensii</i>	<i>V. harveyi</i>	● 2,00	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,18
Vt1, 2	<i>V. tasmaniensis</i> (2)	<i>V. tasmaniensis</i>	● 2,02*	<i>V. tasmaniensis</i>	● 2,19*
Vg1	<i>V. gigantis</i>	<i>V. gigantis</i>	● 2,15	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	● 2,18
Vp1	<i>V. rotiferianus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	● 2,16	<i>V. rotiferianus</i>	● 2,16

* Moyenne de log-score

Un log-score (i) supérieur à 2,3 indique une identification hautement probable à l'espèce (disque vert foncé), (ii) un log-score entre 2,0 et 2,3 une identification probable à l'espèce (disque vert clair), (iii) un log-score compris entre 1,7 et 2,0 indique une identification probable au genre seulement (disque jaune), et (iv) un log-score inférieur à 1,7 indique aucune similarité significative entre un MSP de référence de la base de données et le spectre MALDI-TOF MS expérimental.

D'après ces résultats, la base de données Bruker BioTyper ver. 9.0.0.0 a généré une identification correcte à l'espèce pour seulement 75,3 % des souches et isolats. L'utilisation de la base de données Bruker BioTyper ver. 9.0.0.0 implémentée avec la VibrioBase a, quant à elle, généré une identification correcte à l'espèce pour 77,6 %. Néanmoins, lors du développement de la VibrioBase, les spectres de référence des espèces *Vibrio harveyi* et *Vibrio campbellii* ont été enregistrés au sein d'un même groupe *V. harveyi/campbellii*, rendant ces deux espèces indissociables. En effet, la méthode utilisée, afin d'identifier les isolats environnementaux avant implémentation dans la base de données, c'est-à-dire le séquençage du gène *rpoB*, ne permettait pas de différencier ces deux espèces, génétiquement très proches (Erler *et al.*, 2015). Ainsi cette base de données n'est pas adaptée à l'identification et à la différenciation des espèces potentiellement pathogènes retrouvées en ferme aquacole, et notamment sur Aquanord-Ichtus. C'est dans ce contexte qu'une nouvelle base de données, la Luvibase, a été mise au point.

3. Développement et validation de la Luvibase : Article 2

Statut de l'article Publié dans *Frontiers in Microbiology* (IF : 4,235) : [Mougin et al. \(2020b\)](#)

Objectif de l'étude L'objectif était de développer une méthode afin d'identifier les espèces du clade Harveyi, de manière fiable, par MALDI-TOF MS.

Résultats principaux Une base de données, nommée Luvibase, a été élaborée avec 23 souches de collection, précédemment présentées dans le *Chapitre II, Article 1*, appartenant aux espèces *V. alginolyticus*, *V. azureus*, *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. jasicida*, *V. natriegens*, *V. owensii*, *V. parahaemolyticus*, *V. rotiferianus* et *V. sinaloensis*. Le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S de ces 23 souches a démontré un manque de pouvoir de résolution, par rapport à la technologie MALDI-TOF MS. Enfin, la Luvibase a été validée grâce à l'identification correcte, au niveau de l'espèce, de 62 souches et isolats précédemment identifiés dans le *Chapitre II, Article 1*.

Conclusion L'implémentation de la base de données Bruker BioTyper avec la Luvibase permet l'identification fiable au niveau de l'espèce des souches et isolats appartenant au clade Harveyi. Cette base de données permet ainsi d'améliorer l'identification, au niveau de l'espèce, d'isolats d'origine aquacole.

Article 2

Rapid identification of *Vibrio* species of the the Harveyi clade using MALDI-TOF MS profiling with main spectral profile database implemented with an in-house database: Luvibase

Julia Mougin¹, Christophe Flahaut¹, Roxane Roquigny¹, Maryse Bonnin-Jusserand¹, Thierry Grard¹ and Cédric Le Bris¹

¹ Univ. Littoral Côte d'Opale, UMR 1158 BioEcoAgro, Institut Charles Viollette, USC ANSES, INRAe, Univ. Artois, Univ. Lille, Univ. Picardie Jules Verne, Univ. Liège, Yncréa, F-62200 Boulogne-sur-Mer, France

Keywords: MALDI-TOF MS, *Vibrio*, Harveyi clade, in-house database, Luvibase, environmental isolates

Abstract

Vibrio bacteria, and particularly members of the Harveyi clade, are the causative agents of vibriosis. This disease is responsible for mass mortality events and important economic losses on aquaculture farms. Improvements in surveillance and diagnosis are needed to successfully manage vibriosis outbreaks. 16S rRNA gene sequencing is generally considered to be the gold standard for bacterial identification but the cost and long processing time make it difficult to apply for routine identification. In contrast, MALDI-TOF MS offers rapid diagnosis and is commonly used in veterinary laboratories today. The major limiting factor for using this technique is the low environmental bacterial diversity in the commonly available databases. Here, we demonstrate that the sole use of the commercially available Bruker BioTyper database is not fully adequate for identifying *Vibrio* bacteria isolated from aquaculture farms. We therefore developed a new

in-house database named Luvibase, composed of 23 reference MALDI-TOF mass spectra profiles obtained from *Vibrio* collection strains, mostly belonging to the Harveyi clade. The comparison of the accuracy of MALDI-TOF MS profiling and 16S rRNA gene sequencing revealed a lack of resolution for 16S rRNA gene sequencing. In contrast, MALDI-TOF MS profiling proved to be a more reliable tool for resolving species-level variations within the Harveyi clade. Finally, combining the Luvibase with the Bruker ver. 9.0.0.0 database, led to successful identification of 47 *Vibrio* isolates obtained from moribund abalone, seabass and oysters. Thus, the use of Luvibase allow for increased confidence in identifying *Vibrio* species belonging to the Harveyi clade.

1. Introduction

Bacteria belonging to the *Vibrio* genus, are highly abundant in aquatic environments (Thompson *et al.*, 2004a). Some of them are well-known enteric human pathogens such as *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus* or even *V. cholerae*, known as the causative agent of pandemic cholera (Bonnin-Jusserand *et al.*, 2017). Other *Vibrio* species are pathogenic to aquatic animals such as several species belonging to the Harveyi clade. Associated with a great variety of crustaceans, mollusks or fishes, these bacteria are particularly problematic in aquaculture, causing vibriosis outbreaks and high economic losses (Austin et Zhang, 2006, Novriadi, 2016, Ina-Salwany *et al.*, 2019). The health risk to aquatic animals and the potential development of zoonosis heighten the need for rapid and reliable identification of *Vibrio* species belonging to the Harveyi clade (Cantas et Suer, 2014, Destoumieux-Garzón *et al.*, 2018). Thus, in case of vibriosis outbreaks, appropriate control measures could be designed and rapidly applied. The gold standard method for species identification is 16S rRNA gene sequencing (Chatterjee et Haldar, 2012). However, several studies have highlighted the poor discriminatory power of 16S rRNA sequence-based bacterial identification of *Vibrio* species, due to high genome similarity (Gomez-Gil *et al.*, 2004, Hernandez et Olmos, 2004). Furthermore, this technique is often cost-ineffective and time-consuming, making it labor-intensive to apply in aquaculture facilities in a context of vibriosis outbreaks.

Thus, for rapid diagnosis, most veterinary laboratories routinely use matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry (MALDI TOF MS). The key benefits of this technique are the high throughput and speed combined with automation that provide rapid sample processing on a large scale (Fujinami *et al.*, 2011, Singhal *et al.*, 2015). Previous studies have demonstrated that MALDI-TOF MS is a valuable tool for discriminating among *Vibrio* spp. and closely related species (Hazen *et al.*, 2009, Dieckmann *et al.*, 2010, Eddabra *et al.*, 2012, Schirmeister *et al.*, 2014, Erler *et al.*, 2015). The identification of bacteria relies on the comparison of experimental MALDI TOF MS profiles with reference MALDI TOF MS profiles recorded in a database. The most commonly and widely used database, is the commercially available Bruker BioTyper database (Bruker France S.A.S, Wissembourg, Germany). This latter is mainly intended for human clinical diagnosis. Although considerable efforts have recently been made to implement reference MALDI-TOF MS profiles from environmental strains, this database still lacks coverage of environmental bacterial isolates, particularly marine bacteria (Emami *et al.*, 2012). Therefore, the use of this database for environmental surveys is limited.

To overcome this limitation, one suitable solution is to create an in-house database, adapted to the identification of the species of interest. For instance, Erler *et al.* (2015) created an available free in-house database, named VibrioBase, in order to improve the identification of *Vibrio* isolates at the species level. This database was mainly compiled using *Vibrio* environmental isolates potentially pathogenic for human and thus lacks spectra from potential aquatic animal pathogens. In particular, species belonging to the Harveyi clade, such as *V. owensii*, *V. rotiferianus*, *V. azureus*, or *V. jasicida* are missing from this database. Moreover, spectra from *V. harveyi* and *V. campbellii* have been included in a common *V. harveyi/campbellii* group, making their discrimination impossible. Previous studies have already highlighted the need to find accurate tools allowing discrimination between these two species (Gomez-Gil *et al.*, 2004, Ruwandeepika *et al.*, 2010, Cano-Gomez *et al.*, 2011). The impact of *V. campbellii* in aquaculture facilities may indeed have been underestimated due to unreliable identification.

The aim of this study was to improve the identification of *Vibrio* belonging to the Harveyi clade to the species level using MALDI-TOF MS profiling. More specifically, our objective was to develop a method for the accurate identification of pathogens obtained from moribund abalone (*Haliotis tuberculata*), seabass (*Dicentrarchus labrax*) and oyster (*Crassostrea gigas*) from aquaculture farms. These strains have been previously identified using PCR and sequencing by Mougín *et al.* (2020a). Given that the MALDI BioTyper was not adequate for species identification, we constructed an in-house database, named Luvibase. Reference MALDI-TOF mass spectra profiles, also shortened as mass spectra profiles (MSPs), obtained from 23 *Vibrio* collection strains were incorporated into the Luvibase. We then compared MALDI-TOF MS profiling with 16S rRNA gene sequencing for species identification. Finally, the identification of 62 environmental isolates was performed using the Bruker BioTyper ver. 9.0.0.0 database supplemented with the Luvibase, to provide evidence of the usefulness of this augmented database.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and culture conditions

A total of 85 strains were used in this study (Table 1). These strains were described and identified by PCR, sequencing of house-keeping genes or whole genome sequencing in a previous study (Mougín *et al.*, 2020a). Briefly, (i) 38 collection strains were obtained from the Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM/LMG), the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ), the Spanish Type Culture Collection (CECT), and the Institut Pasteur Collection (CIP), (ii) 35 isolates were obtained from a fish farm (Aquanord-Ichtus, Gravelines, France) raising seabass (*Dicentrarchus labrax*) and (iii) 12 isolates were isolated by the French Research Institute for the Exploitation of the Sea (IFREMER) from oysters (*Crassostrea gigas*) and abalone (*Haliotis tuberculata*). Before all experiments, bacteria were first sub-cultured on marine agar (MA), (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) and incubated for 24 h, at growth temperature. Second, a single colony forming unit (CFU) was plated on MA (Difco Laboratories) and incubated 24 h, at growth temperature, to ensure the

purity of the isolates. This growth temperature was 37 °C, except for LMG 11216^T, Vh2, Vh3, Vt1, Vt2 and Vg1, for which the growth temperature was 25 °C.

2.2. 16S rRNA gene sequencing and sequence analysis

The DNA of 23 *Vibrio* collection strains was extracted from pure culture, isolated from MA agar using the DNeasy Blood&Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) and an automated nucleic acid extractor QIAcube Connect (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. The final elution volume was 100 µL. The extracted DNA was then stored at -20 °C until use. PCR amplification of the 1465 bp 16S rRNA gene fragment (V1-V8 region) was performed as described in [Bauer *et al.* \(2018\)](#) using the primers 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492r (5'-ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). The primers were synthesized by TIB MOLBIOL (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Germany) and were suspended in nuclease-free water to reach a final concentration of 10 µM and stored at -20 °C. The PCR reaction mixture contained 25 µL of 2× PlatinumTM Green Hot Start PCR Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 µL of each primer (10 µM), 5 µL of template DNA, and 18 µL of nuclease-free water to a final volume of 50 µL. The PCR reaction was run on a Thermal Cycler (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA), under the following conditions: 3 min at 95 °C, followed by 30 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 55 °C, and 1 min at 72 °C. The final cycle was followed by an additional 7 min of extension at 72 °C. Each run included a no template control (NTC), DNA-free. The size of the PCR product was verified using ethidium bromide agarose gel electrophoresis (2%). The PCR products of expected size were then paired-end sequenced, using Sanger sequencing by GenoScreen (Lille, France).

Sequence analysis was performed using the nucleotide BLAST search program with the GenBank database (NCBI). A strict identification criterion of $\geq 99\%$ sequence identity for identification to the species level was applied ([Janda *et al.* \(2007\)](#)). A distance tree was generated using CLC Genomics Workbench ver. 20.0.2. The unweighted pair grouping method with arithmetic-mean (UPGMA) hierarchical clustering algorithm was used with the Jukes-Cantor distance.

2.3. Preparation of bacterial extracts and target-loading for MALDI-TOF MS profiling

The cellular proteins of 23 *Vibrio* collection strains were extracted from bacterial cells according to manufacturer's recommendations (Bruker France S.A.S., Wissembourg, Germany). Fresh colonies were picked with a 1 μL inoculation loop and placed in 300 μL of water (ULC/MS-CC/SFC, Biosolve Chimie, Dieuze, France). A volume of 900 μL of pure ethanol (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France) was added. The tube was vortexed for 1 min and centrifuged at $13000\times g$ for 2 min. The supernatant was removed and the pellet was centrifuged a second time for 15 s, to eliminate as much ethanol as possible. Thereafter, pellets were air dried under a fume hood for 20 min. Once dried, pellets were dissolved into 30 μL of 70% formic acid (Alfa Aesar, Kandel, Germany). An equal volume of 100% acetonitrile (Biosolve Chimie) was added and the solution was mixed carefully by pipetting up and down. The tube was then centrifuged at $13000\times g$ for 2 min. The extracts were stocked at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. Subsequently, 1 μL of the supernatant from each protein extract was spotted onto a clean ground steel MTP 384-target plate (Bruker France S.A.S.) in 24 replicates. After air-drying, each spot was overlaid with 1 μL of a $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ matrix solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) in 50% acetonitrile and 2.5% trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2.4. Acquisition of MALDI-TOF MS profiles

MALDI-TOF-MS analysis was performed using an Autoflex SpeedTM (Bruker France S.A.S.), running Flexcontrol ver. 3.4 software (Bruker France S.A.S.). The Bruker bacterial test standard (BTS, Bruker France S.A.S.) was used to calibrate the mass spectrometer before each run, according to the manufacturer's recommendations. Mass spectra were acquired in the positive linear ion mode across a mass-to-charge (m/z) ratio of 2000-20000 Da. The mass spectra were acquired using the manufacturer's automatic method MBT_FC.par. For each MALDI-TOF MS profile, mass spectra obtained from 5000 laser shots in 1000 shot steps performed randomly on different areas of the spot were accumulated.

2.5. Creation of the Luvibase, an in-house main spectral profile database

Each of the 23 MALDI-TOF MS profiles obtained from 24 MALDI-target spots were analyzed and processed using FlexAnalysis ver. 3.4 (Bruker France S.A.S.). MALDI-TOF MS profiles with a signal intensity lower than 10^4 arbitrary units (a.u.) were discarded. A minimum of 18 MALDI-TOF MS profiles were used to create an MSP using MALDI BioTyper Compass Explorer ver. 4.1 software (Bruker France S.A.S.). All 23 MSPs were registered in an in-house database called Luvibase. In order to ensure the repeatability of the assay, three cultures of each strain were performed and the similarity of mass spectra of each culture was confirmed.

An MSP dendrogram was generated using MALDI BioTyper Compass Explorer ver. 4.1 (Bruker France S.A.S.) using the Euclidean distance measure and a complete coverage algorithm.

2.6. Bacterial identification using MALDI-TOF MS profiling

A single CFU, isolated from a fresh bacterial culture, was spotted onto a clean ground steel MTP 384-target plate (Bruker France S.A.S.) in four replicates. Then, 1 μ L of 70% formic acid (Alfa Aesar) was overlaid on each spot. After air-drying at room temperature, 1 μ L of CHCA solution in 50% acetonitrile and 2.5% trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich) was added to each spot and air-dried. Subsequently, the above mentioned MALDI-TOF parameters were used to acquire the MALDI-TOF MS profiles.

Each MALDI-TOF MS profile was first compared to the MSPs of the Bruker BioTyper database ver. 9.0.0.0 (Bruker France S.A.S.) and then to the MSPs of the Bruker BioTyper database ver. 9.0.0.0 supplemented with the Luvibase. The concordance degree between experimental MALDI-TOF MS profiles and the MSPs was evaluated using the log-score calculated by MALDI BioTyper Compass Explorer ver. 4.1 (Bruker France S.A.S.). A log-score greater than 2.3 indicates a highly probable identification at the species level. A log-score between 2.0 and 2.3 indicates a probable identification at the species level. A log-score between 1.7 and 2.0 indicates a probable identification at the genus level only. A log-score below 1.7 indicates no significant similarities between MSPs included in the databases and the tested profile.

3. Results

3.1. Identification of *Vibrio* bacteria using the Bruker ver. 9.0.0.0 database

We acquired MALDI-TOF MS profiles for 85 *Vibrio* bacterial strains, classified into 13 *Vibrio* species mostly belonging to the Harveyi clade, were acquired. These spectra were first compared to the MSPs included in the Bruker ver. 9.0.0.0 database. The bacterial identifications previously obtained in the study of Mougín *et al.* (2020a) were then compared with the MALDI-TOF MS profile-based bacterial identifications. The matching rates were 100% at the genus level and only 75.3% at the species level, assuming a log-score of at least 2.0 required for probable species identification (Table 1). A total of 19 bacterial strains were misidentified using the Bruker ver. 9.0.0.0 database, involving the 6 following species: *V. campbellii*, *V. owensii*, *V. azureus*, *V. jasicida*, *V. sinaloensis*, and *V. rotiferianus*. (i) All *V. campbellii* collection strains, LMG 21363, LMG 11256, CIP 70.67, LMG 16862, LMG 16863 LMG 11216 and LMG 10946 were misidentified as *V. parahaemolyticus* or *V. harveyi* (log-score > 2); (ii) all *V. owensii* collections strains, DSMZ 23055^T, LMG 25430^T, LMG 20370, LMG 4043 LMG 11659, LMG 10947 and the *V. owensii* isolate Vh28 were misidentified as *V. harveyi* (log-score > 2); (iii) the *V. jasicida* collection strain CECT 8524 and the *V. jasicida* isolate Vh2 were misidentified as *V. harveyi* (log-score > 2); (iv) the *V. azureus* collection strains LMG 25266^T was misidentified as *V. parahaemolyticus* (log-score > 2); (v) the *V. rotiferianus* isolate Vp1 was misidentified as *V. parahaemolyticus* whereas the *V. rotiferianus* collection strain LMG 21456 was correctly identified (log-score > 2) and (vi) the *V. sinaloensis* collection strain CECT 7298^T was identified to the genus level only ($1.7 < \text{log-score} < 2$). Therefore, we constructed an in-house database to provide a reliable identification of bacteria belonging to these 6 species.

Table 1. Comparison between 16S rRNA gene sequencing identification results and MALDI-TOF MS profile-based identification of *Vibrio* species using the Bruker BioTyper ver. 9.0.0.0 database alone and supplemented with the Luvibase. Bacterial isolates were previously identified using PCR and sequencing by Mougín *et al.* (2020a). Green shading = MALDI-TOF MS identifications matching the assigned species identifications; red shading = MALDI-TOF MS identifications not matching the assigned species identifications.

Tested strains/Isolates	Assigned species	16S rRNA gene sequencing		MALDI-TOF MS			
		Identification	Percent similarity (%)	Bruker database Identification	log-score	Bruker database + Luvibase Identification	log-score
Collection strains in the Luvibase (23)							
LMG 23688	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	99	<i>V. harveyi</i>	● 1.91	<i>V. harveyi</i>	● 2.64
LMG 18299	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	100	<i>V. harveyi</i>	● 2.28	<i>V. harveyi</i>	● 2.36
LMG 22894	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	100	<i>V. harveyi</i>	● 2.36	<i>V. harveyi</i>	● 2.45
LMG 22895	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	100	<i>V. harveyi</i>	● 2.22	<i>V. harveyi</i>	● 2.45
LMG 11755	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	100	<i>V. harveyi</i>	● 2.33	<i>V. harveyi</i>	● 2.44
LMG 21363	<i>V. campbellii</i>	<i>V. campbellii/V. harveyi</i>	100	<i>V. parahaemolyticus</i>	● 2.09	<i>V. campbellii</i>	● 2.38
LMG 11256	<i>V. campbellii</i>	<i>V. campbellii/V. harveyi</i>	100	<i>V. parahaemolyticus</i>	● 2.17	<i>V. campbellii</i>	● 2.32
CIP 70.67	<i>V. campbellii</i>	<i>V. campbellii/V. harveyi</i>	99	<i>V. harveyi</i>	● 2.20	<i>V. campbellii</i>	● 2.44
LMG 16862	<i>V. campbellii</i>	<i>V. campbellii/V. harveyi</i>	100	<i>V. harveyi</i>	● 2.22	<i>V. campbellii</i>	● 2.45
LMG 16863	<i>V. campbellii</i>	<i>V. campbellii/V. harveyi</i>	100	<i>V. harveyi</i>	● 2.25	<i>V. campbellii</i>	● 2.30
DSMZ 23055 ^T	<i>V. owensii</i>	<i>V. owensii/V. hyugaensis/V. vulnificus/V. harveyi</i>	100	<i>V. harveyi</i>	● 2.14	<i>V. owensii</i>	● 2.37
LMG 25430 ^T	<i>V. owensii</i>	<i>V. hyugaensis/V. owensii/V. vulnificus/V. harveyi</i>	100	<i>V. harveyi</i>	● 2.16	<i>V. owensii</i>	● 2.35
LMG 20370	<i>V. owensii</i>	<i>V. hyugaensis/V. owensii/V. harveyi</i>	100	<i>V. harveyi</i>	● 2.15	<i>V. owensii</i>	● 2.27
LMG 4043	<i>V. owensii</i>	<i>V. vulnificus/V. hyugaensis/V. owensii/V. harveyi</i>	100	<i>V. harveyi</i>	● 2.27	<i>V. owensii</i>	● 2.37
LMG 21456	<i>V. rotiferianus</i>	<i>V. harveyi/V. campbellii</i>	100	<i>V. rotiferianus</i>	● 2.28	<i>V. rotiferianus</i>	● 2.44
LMG 2850 ^T	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	100	<i>V. parahaemolyticus</i>	● 2.40	<i>V. parahaemolyticus</i>	● 2.29
LMG 16838	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus/V. mediterranei/V. natriegens/V. neonatus/V. azureus/V. alginolyticus</i>	100	<i>V. parahaemolyticus</i>	● 2.39	<i>V. parahaemolyticus</i>	● 2.42
LMG 11650	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus/V. natriegens/V. azureus</i>	100	<i>V. alginolyticus</i>	● 2.24	<i>V. alginolyticus</i>	● 2.33
LMG 4409 ^T	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus/V. azureus</i>	100	<i>V. alginolyticus</i>	● 2.12	<i>V. alginolyticus</i>	● 2.13
LMG 10950	<i>V. natriegens</i>	<i>V. natriegens</i>	97.18	<i>V. natriegens</i>	● 2.16	<i>V. natriegens</i>	● 2.11

Tested strains/Isolates	Assigned species	16S rRNA gene sequencing		MALDI-TOF MS			
		Identification	Percent similarity (%)	Bruker database		Bruker database + Luvibase	
				Identification	log-score	Identification	log-score
LMG 25266 ^T	<i>V. azureus</i>	<i>V. azureus/V. campbellii/V. alginolyticus</i>	100	<i>V. parahaemolyticus</i>	● 2.17	<i>V. azureus</i>	● 2.35
CECT 8524	<i>V. jasicida</i>	<i>V. azureus/V. hyugaensis</i>	100	<i>V. harveyi</i>	● 2.41	<i>V. jasicida</i>	● 2.54
CECT 7298 ^T	<i>V. sinaloensis</i>	<i>V. sinaloensis</i>	100	<i>V. brasiliensis</i>	● 1.87	<i>V. sinaloensis</i>	● 2.36
Collection strains in the Bruker database tested (6)							
LMG 4044 ^T	<i>V. harveyi</i>			<i>V. harveyi</i>	● 2.18	<i>V. harveyi</i>	● 2.24
LMG 7890	<i>V. harveyi</i>			<i>V. harveyi</i>	● 2.28	<i>V. harveyi</i>	● 2.46
LMG 19643	<i>V. harveyi</i>			<i>V. harveyi</i>	● 2.15	<i>V. harveyi</i>	● 2.22
LMG 11216	<i>V. campbellii</i>			<i>V. harveyi</i>	● 2.25	<i>V. campbellii</i>	● 2.44
DSMZ 17186 ^T	<i>V. rotiferianus</i>			<i>V. rotiferianus</i>	● 2.19	<i>V. rotiferianus</i>	● 2.42
DSMZ 19137 ^T	<i>V. mytili</i>			<i>V. mytili</i>	● 2.21	<i>V. mytili</i>	● 2.00
Other collection strains tested (9)							
LMG 23442	<i>V. harveyi</i>			<i>V. harveyi</i>	● 2.30	<i>V. harveyi</i>	● 2.31
LMG 16832	<i>V. harveyi</i>			<i>V. harveyi</i>	● 2.35	<i>V. harveyi</i>	● 2.43
LMG 23678	<i>V. harveyi</i>			<i>V. harveyi</i>	● 2.36	<i>V. harveyi</i>	● 2.33
LMG 11226	<i>V. harveyi</i>			<i>V. harveyi</i>	● 2.28	<i>V. harveyi</i>	● 2.31
LMG 23680	<i>V. harveyi</i>			<i>V. harveyi</i>	● 2.36	<i>V. harveyi</i>	● 2.39
LMG 10946	<i>V. campbellii</i>			<i>V. parahaemolyticus</i>	● 2.19	<i>V. campbellii</i>	● 2.37
LMG 10947	<i>V. owensii</i>			<i>V. harveyi</i>	● 2.26	<i>V. owensii</i>	● 2.33
LMG 11659	<i>V. owensii</i>			<i>V. harveyi</i>	● 2.21	<i>V. owensii</i>	● 2.32
CECT 526 ^T	<i>V. natriegens</i>			<i>V. natriegens</i>	● 2.27	<i>V. natriegens</i>	● 2.25
Identified isolates tested (47)							
Vh1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 29, 31, 32, 33, 34, 35,	<i>V. harveyi</i> (40)			<i>V. harveyi</i>	● 2.19*	<i>V. harveyi</i>	● 2.28*

Tested strains/Isolates	Assigned species	16S rRNA gene sequencing		MALDI-TOF MS			
		Identification	Percent similarity (%)	Bruker database Identification	log-score	Bruker database + Luvibase Identification	log-score
36, 37, 38, 43, 45, 47, 48, 51, 52, 53							
Vh2	<i>V. jasicida</i>			<i>V. harveyi</i>	● 2.18	<i>V. jasicida</i>	● 2.39
Vh15	<i>V. rotiferianus</i>			<i>V. rotiferianus</i>	● 2.29	<i>V. rotiferianus</i>	● 2.38
Vh28	<i>V. owensii</i>			<i>V. harveyi</i>	● 2.00	<i>V. owensii</i>	● 2.29
Vt1, 2	<i>V. tasmaniensis</i> (2)			<i>V. tasmaniensis</i>	● 2.02*	<i>V. tasmaniensis</i>	● 2.02*
Vg1	<i>V. gigantis</i>			<i>V. gigantis</i>	● 2.15	<i>V. gigantis</i>	● 2.15
Vp1	<i>V. rotiferianus</i>			<i>V. parahaemolyticus</i>	● 2.16	<i>V. rotiferianus</i>	● 2.31

*Mean of log-scores

A log-score (i) greater than 2.3 indicates a highly probable identification at the species level (dark green circle), (ii) between 2.0 and 2.3 indicates a probable identification at the species level (light green circle), (iii) between 1.7 and 2.0 indicates a probable identification at the genus level only (yellow circle) and (iv) below 1.7 indicates no significant similarities between the reference MSPs included in the databases and the experimental MALDI-TOF MS profiles.

3.2. Creation of the in-house database, Luvibase

MSPs, derived from 23 *Vibrio* collection strains, were created and recorded in the in-house database: Luvibase (Tables 1 & 2). The Luvibase includes the MSPs of 12 collection strains classified into the 6 species that yielded unreliable identifications: *V. campbellii*, *V. owensii*, *V. azureus*, *V. jasicida*, *V. sinaloensis*, and *V. rotiferianus*. In addition, the MSPs of 11 collection strains classified as *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* and *V. natriegens* were included in the Luvibase.

Table 2. Number of *Vibrio* strains included in the Bruker BioTyper database ver. 9.0.0.0 and in the Luvibase

Species	No. of strains in the Bruker database	No. of strains in the Luvibase
<i>Vibrio harveyi</i>	7	5
<i>Vibrio campbellii</i>	1	5
<i>Vibrio owensii</i>	0	4
<i>Vibrio alginolyticus</i>	5	2
<i>Vibrio rotiferianus</i>	1	1
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	9	2
<i>Vibrio natriegens</i>	2	1
<i>Vibrio azureus</i>	0	1
<i>Vibrio jasicida</i>	0	1
<i>Vibrio sinaloensis</i>	0	1

As illustrated in Figure 1, each MSP of the 10 *Vibrio* species implemented in the Luvibase, gave a unique and reproducible species-specific MSP. Minor visual differences were perceptible between these MSPs: they were clearly similar but not identical.

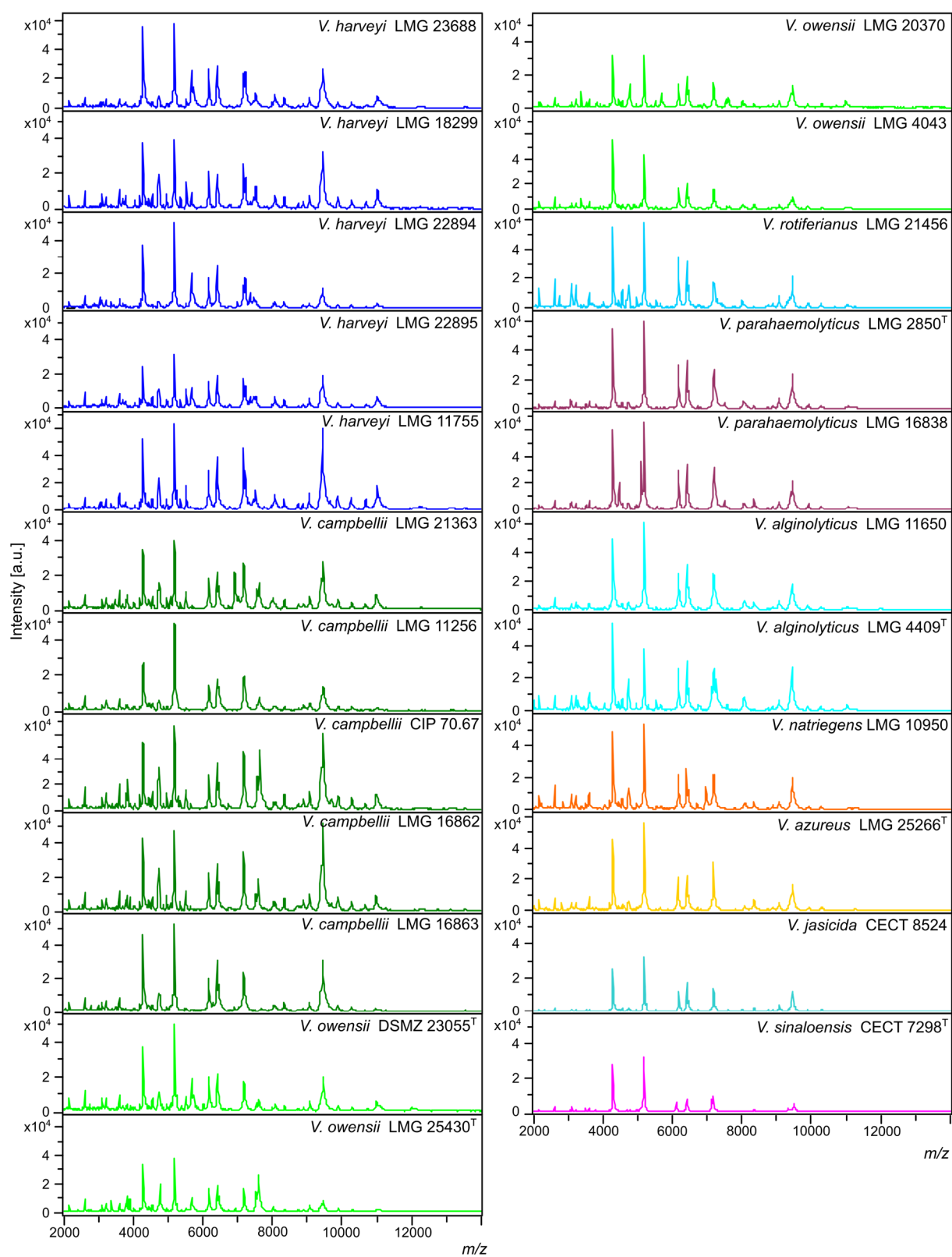


Figure 1. Main spectral profiles (MSPs) of the 23 *Vibrio* strains included in the Luvibase. The whole 2000-14000 m/z spectra are shown (a.u., arbitrary units; m/z , mass to charge ratio).

3.3. Identification of the strains included in the Luvibase using 16S rRNA gene sequencing

The 16S rRNA gene sequences (V1-V8 region) of the 23 strains included in the Luvibase were obtained and identification was performed using the nucleotide BLAST search program with the GenBank database (NCBI). For most of the fragments, the sequence similarity obtained was above the strict threshold defined for identification at the species level ($\geq 99\%$ sequence similarity). The sequence similarity obtained from fragment acquired from the LMG 10950 *V. natriegens* collection strain was below the threshold (97.48%), and was thus identified at the genus level only. Nevertheless, 15/22 strains could not be identified due to high sequence similarities with more than one species (Table 1): strains belonging to *V. campbellii*, *V. owensii*, *V. rotiferianus*, *V. alginolyticus*, *V. azureus*, and *V. jasicida* could not be correctly identified. On both *V. parahaemolyticus* strains, only the LMG 2850^T collection strain was correctly identified whereas the LMG 16838 collection strain was incorrectly identified. Strains belonging to *V. harveyi* and *V. sinaloensis* were correctly identified.

3.4. Comparison of 16S rRNA gene sequencing to MALDI-TOF profiling for identification of species included in the Luvibase

To evaluate the agreement between species discrimination using 16S rRNA gene sequencing and MALDI-TOF MS profiling, a hierarchical distance tree, based on the 16S rRNA gene sequences obtained from the 23 strains in the Luvibase, and a MSP dendrogram based on the MSPs included in the Luvibase were generated (Fig 2).

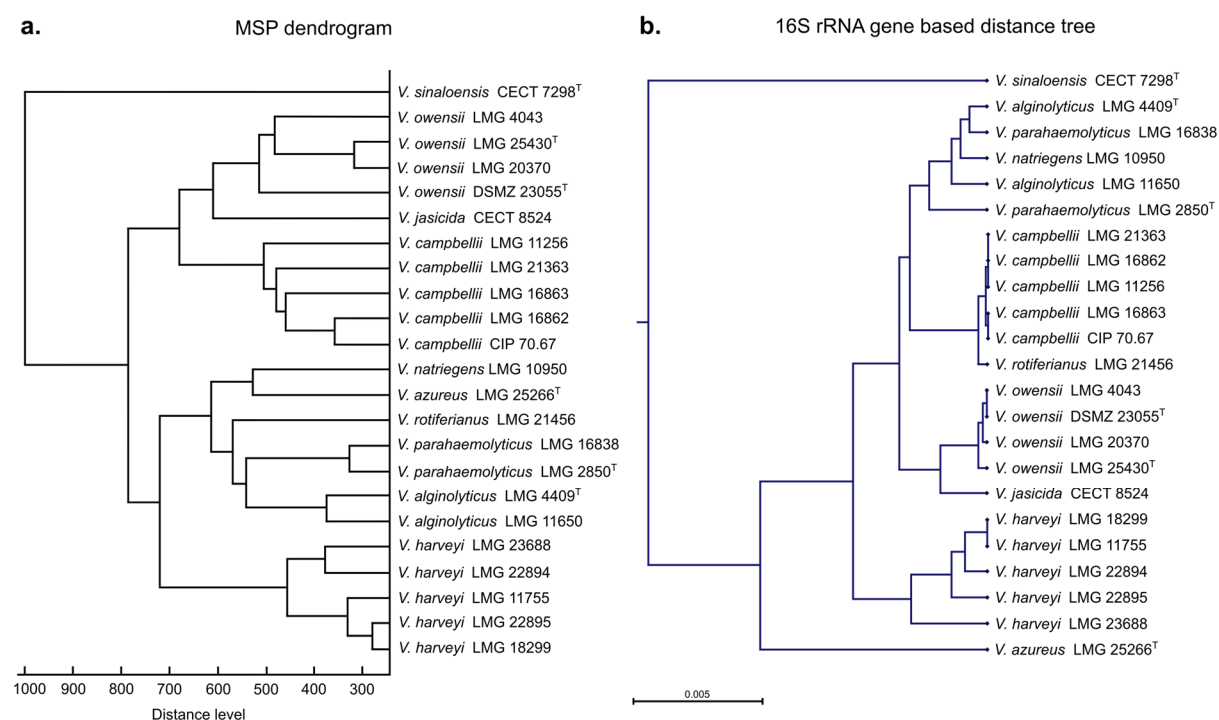


Figure 2. Comparison of (a) main spectral profile (MSP) dendrogram based on MALDI-TOF MS profiling analysis and (b) 16S rRNA gene-based distance tree resulting based on 16S rRNA gene sequencing of 23 *Vibrio* strains included in the Luvibase.

Using both techniques, all strains belonging to the Harveyi clade were grouped together and *V. sinaloensis*, which belongs to the Orientalis clade, was easily distinguishable. Nevertheless, comparison between the MSP dendrogram and the 16S rRNA gene-based distance tree revealed that the clusters within the Harveyi clade differed between the two techniques. Analysis of clusters resulting from MALDI-TOF MS profiling highlighted species-specific groups, but analysis of clusters from 16S rRNA gene sequencing were not all species-specific. The 16S rRNA gene sequences of *V. alginolyticus*, *V. natriegens* and *V. parahaemolyticus* clustered together. These findings suggest that the two techniques have different taxonomic resolution.

3.5. Identification of *Vibrio* bacteria using the Bruker ver. 9.0.0.0 database supplemented with the Luvibase

To evaluate the effectiveness of the Luvibase for identification of unknown isolates, the 85 *Vibrio* bacteria were re-identified. The Bruker BioTyper database supplemented with the Luvibase and

bacterial identification results are summarized in Table 1. The matching rates were 100% at both the genus and the species levels, assuming a log-score of at least 2.0 required for probable species identification (Table 1).

Overall, the mean of log-score obtained with the Bruker BioTyper ver. 9.0.0.0 database was 2.21 ± 0.12 , whereas the mean of log-score obtained with the Bruker BioTyper ver. 9.0.0.0 database supplemented with the Luvibase was 2.34 ± 0.12 . Thus, the Bruker BioTyper ver. 9.0.0.0 database gave mostly “probable species identifications” (log-score < 2.3) while the augmented database gave “secure species identifications” (log-score ≥ 2.3).

All experiments were validated by negative and positive control spots. The negative control spots yielded no peaks or faint profiles that could not be identified by the system, and the positive control spots yielded the expected *Escherichia coli* DH5alpha identification score of 2.0-2.5.

4. Discussion

Genomic-based methods for *Vibrio* identification, such as PCR and sequencing, offer accurate identification, assuming the use of a specific and reliable target gene (Cano-Gomez *et al.*, 2009). However, they are also labor-intensive, requiring highly trained operators and are not particularly suitable for proceeding a large quantity of samples. On the contrary, MALDI-TOF MS is an automated, rapid, cost-effective and useful tool for bacterial species identification. This technique has been successfully used to discriminate closely related *Vibrio* species (Dieckmann *et al.*, 2010, Erler *et al.*, 2015). The major limitation is the lack of MSP diversity in the main available spectral profile databases (Clark *et al.*, 2013).

The Bruker BioTyper ver. 9.0.0.0 database includes 111 MSPs obtained from 53 different *Vibrio* species (Table S1). As expected, strains belonging to *V. owensii*, *V. azureus*, *V. jasicida* and *V. sinaloensis* species were not correctly identified because their MSPs are not included. Consistently, the *V. sinaloensis* spectrum did not specifically match any MSP and was identified to the genus level only. However, the MALDI-TOF MS profiles for *V. owensii*, *V. azureus* and

V. jasicida matched the MSPs of other *Vibrio* strains with log scores ≥ 2 or ≥ 2.3 , the recommended standard thresholds for probable or secure species identification, respectively. These inaccurate bacterial identification matches highlight the high similarity of MALDI-TOF MS profiles between *Vibrio* species. In contrast, the Bruker BioTyper ver. 9.0.0.0 database does include one MSP for *V. campbellii* and *V. rotiferianus*. All MALDI-TOF MS profiles from strains classified as *V. campbellii* matched the MSPs of other *Vibrio* species. The MALDI-TOF MS profile from a *V. rotiferianus* isolate did not match the MSP of its own species. Nonetheless, the MALDI-TOF MS profiles from the other *V. rotiferianus* strains correctly matched the species MSP. These findings suggest that including only one MSP in a MSP database is not sufficient for secure species identification, perhaps partly due to the high heterogeneity between environmental isolates. For instance, the geographic diversity of *V. parahaemolyticus* isolates can lead to divergences in MALDI-TOF MS profiles (Hazen *et al.*, 2009). To ensure high epidemiological coverage, more MSPs must be recorded in the bacterial identification databases. Thus, the reliable identification of the causative agents of disease outbreaks in aquaculture requires the construction of a database including different strains of *V. parahaemolyticus* and related species.

Here, we constructed a new in-house database, named Luvibase, in order to improve the identification of *Vibrio* belonging to the Harveyi clade at the species level. The MSPs of 23 *Vibrio* species were acquired and included. Overall, the use of the Luvibase in addition to the Bruker BioTyper ver. 9.0.0.0 database provided more reliable identification than the sole use of the Bruker BioTyper ver. 9.0.0.0 database. Moreover, the cluster analysis highlighted the capacity of MALDI-TOF MS profiling to discriminate between closely related species. Remarkably, the method allowed accurate identification and discrimination between *V. harveyi*, *V. campbellii* and *V. rotiferianus* whose 16S rRNA gene sequences have more than 99% similarity (Gomez-Gil *et al.*, 2003, Gomez-Gil *et al.*, 2004).

16S rRNA gene sequencing is currently considered the gold standard for bacterial identification. However, in our study, only a few strains could be correctly identified to the species level due to

high 16S rRNA gene sequence similarities between *Vibrio* species belonging to the Harveyi clade. Moreover, the 16S rRNA gene-based distance tree analysis highlighted a close relationship between the 16S rRNA gene sequences of *V. alginolyticus*, *V. natriegens* and *V. parahaemolyticus*. Importantly, the discrimination between these species proved to be laborious, because they shared high similarity in their 16S rRNA gene sequences (Dorsch *et al.*, 1992, Thompson *et al.*, 2009). Instead of the 16S rRNA gene sequencing, Dieckmann *et al.* (2010) demonstrated that the partial *rpoB* gene sequencing can resolve species-level variations between *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus*. Thus, the 16S rRNA gene is not a reliable target gene for discrimination between these species. Generally speaking, 16S rRNA gene sequencing is not suitable for species identification within the Harveyi clade which form a tight cluster with more than 99% sequence similarities (Cano-Gomez *et al.*, 2011). In contrast, MALDI-TOF MS profiling had higher resolving power. This technique is based on the analysis of a large spectrum of peptides/proteins generated from the whole cell, while 16S rRNA gene sequencing is based only on a 1500 bp gene. Thus, MALDI-TOF MS profiling enables the characterization of proteomic differences between bacteria with highly similar 16S rRNA gene sequences. For this reason, in our study, MALDI-TOF MS profiling gave a more accurate bacterial identification than 16S rRNA gene sequencing. In addition, there is no universal consensus of an established threshold value for sequence similarity above which strains can unambiguously be identified to the species level, using 16S rRNA gene sequencing (Janda *et al.*, 2007). Attempts to propose an optimal threshold of 98.65% when using 16S rRNA gene sequencing for species identification are stymied by the fact that some species share more than 99% gene sequence similarity (Kim *et al.*, 2014a). In contrast, the log-score threshold values for MALDI-TOF MS identification are well defined and universally applicable. Overall, the implementation of the Bruker BioTyper database along with the Luvibase, for bacterial identification using MALDI-TOF MS appears to be an appropriate, convenient and powerful tool to discriminate between closely related species belonging to the Harveyi clade.

Standard conditions must be well defined and applied to ensure reliability and reproducibility of MALDI-TOF MS identification. The divergence between methods can lead to divergence between

mass signals and thus MALDI-TOF MS profiles (Santos *et al.*, 2016). Several studies have highlighted the importance of cell growth conditions, culture age, matrices, solvents and method of sample application on the target plate (Evason *et al.*, 2001, Williams *et al.*, 2003, Vargha *et al.*, 2006). These parameters may affect the spectra and, thus the associated identifications. However, there is a controversy regarding the impact of growth conditions. Some studies claimed that even if the spectrum is slightly modified, identification to the species level remain possible (Valentine *et al.*, 2005, Usbeck *et al.*, 2013). For instance, the use of different culture media for *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus subtilis*, and *Escherichia coli* identification by MALDI-TOF MS profiling showed an unambiguous core set of proteins, ensuring reliable identification regardless the culture media (Valentine *et al.*, 2005). Recently, the identification of *V. anguillarum* pathogens isolated from seabass and seabream (*Sparus aurata*) revealed that differences in culture media and incubation period have no effect on MALDI-TOF MS profiles but divergences in growth temperature may affect MALDI-TOF MS profiles (Kazazić *et al.*, 2019). Importantly, because the spectra of different species may not be affected by the same parameters, the effect of altering procedures should be studied for each single species. To our knowledge, no such studies have been undertaken for *Vibrio* species belonging to the Harveyi clade. Procedures clearly need to be standardized to ensure consistent identification between laboratories.

5. Conclusion

This work revealed discrepancies between *Vibrio* species discrimination using 16S rRNA gene sequencing and MALDI-TOF MS profiling. In our study, MALDI-TOF MS profiling provided better resolution because this technique is based on the analysis of a large spectrum of peptides/proteins from the whole cell, whereas 16S rRNA gene sequencing is based on a single 1500 bp gene. Therefore, 16S rRNA gene sequences exhibit high similarities between *Vibrio* species. However, the success of bacterial identification using MALDI-TOF profiling relies on the reference strains registered in databases. As demonstrated in the present study, the sole use of the Bruker BioTyper ver. 9.0.0.0 database is not suitable for identification of *Vibrio* isolates from aquaculture farms. For that reason, we constructed the Luvibase, an in-house database suitable

for the discrimination of *Vibrio* species belonging to the Harveyi clade. The Luvibase combined with the Bruker BioTyper database can be used for pathogen identification in aquaculture farms. The combination of these both databases led to reliable identification of the strains belonging to *V. campbellii*, *V. owensii*, *V. azureus*, *V. jasicida*, *V. sinaloensis*, and *V. rotiferianus*, whereas the use of the Bruker BioTyper database alone gave incorrect identifications. Therefore, veterinary laboratories can use the augmented database for the rapid and reliable diagnosis of vibriosis outbreaks. In the case of an identified outbreak, suitable control methods could be then undertaken to limit the spread of the disease. The inclusion of additional environmental isolates in the Luvibase could then expand the coverage and the use of this technique.

Funding

Julia Mougin would like to thank the Hauts-de-France regional council and ULCO for their financial support of her PhD work. This work was funded by the French government, IFREMER and the region Hauts-de-France as part of the CPER 2014-2020 MARCO project. This work was also supported by a grant from FEAMP (PFEA470017FA1000006) as part of the LUVIBAR project.

Acknowledgements

The authors thank Aquanord-Ictus for contributing to the LUVIBAR project, especially Guillaume Tielie, Anabelle Duhamel and Céline Doyen. The authors are also grateful to the REALCAT platform funded by a French governmental grant administered by the French National Research Agency (ANR) as part of the frame of the ‘Investments for the Future’ program (ANR-11-EQPX-0037) and Egon Heuson for helpful assistance. The authors thank the National Reference Laboratory for mollusk diseases for sharing *V. harveyi* strains, and the French Directorate General for Food (DGAL) for funding the NRL. Finally, the authors thank the LABOCEA veterinary laboratory for sharing *V. harveyi* strains isolated from Aquanord-Ictus.

References

- Austin, B., and Zhang, X.H. (2006). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett. Appl. Microbiol.* 43(2), 119-124. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01989.x.
- Bauer, J., Teitge, F., Neffe, L., Adamek, M., Jung, A., Pepler, C., et al. (2018). Recommendations for identifying pathogenic *Vibrio* spp. as part of disease surveillance programmes in recirculating aquaculture systems for Pacific white shrimps (*Litopenaeus vannamei*). *J. Fish Dis.* 41(12), 1877-1897. doi: 10.1111/jfd.12897.
- Bonnin-Jusserand, M., Copin, S., Le Bris, C., Brauge, T., Gay, M., Brisabois, A., et al. (2017). *Vibrio* species involved in seafood-borne outbreaks (*Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*): Review of microbiological versus recent molecular detection methods in seafood products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 59(4), 597-610. doi: 10.1080/10408398.2017.1384715
- Cano-Gomez, A., Bourne, D.G., Hall, M.R., Owens, L., and Høj, L. (2009). Molecular identification, typing and tracking of *Vibrio harveyi* in aquaculture systems: Current methods and future prospects. *Aquaculture* 287(1-2), 1-10. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.10.058.
- Cano-Gomez, A., Høj, L., Owens, L., and Andreakis, N. (2011). Multilocus sequence analysis provides basis for fast and reliable identification of *Vibrio harveyi*-related species and reveals previous misidentification of important marine pathogens. *Syst. Appl. Microbiol.* 34(8), 561-565. doi: 10.1016/j.syapm.2011.09.001.
- Cantas, L., and Suer, K. (2014). Review: the important bacterial zoonoses in "one health" concept. *Front. Public Health* 2, 144. doi: 10.3389/fpubh.2014.00144.
- Chatterjee, S., and Haldar, S. (2012). *Vibrio* related diseases in aquaculture and development of rapid and accurate identification methods. *J. Mar. Sci.: Res. Dev.* 1, 1-7. doi: 10.4172/2155-9910.S1-002.
- Clark, A.E., Kaleta, E.J., Arora, A., and Wolk, D.M. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 26(3), 547-603. doi: 10.1128/CMR.00072-12.
- Destoumieux-Garzón, D., Mavingui, P., Boëtsch, G., Boissier, J., Darriet, F., Duboz, P., et al. (2018). The one health concept: 10 years old and a long road ahead. *Front. Vet. Sci.* 5, 14. doi: 10.3389/fvets.2018.00014.
- Dieckmann, R., Strauch, E., and Alter, T. (2010). Rapid identification and characterization of *Vibrio* species using whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Appl. Microbiol.* 109(1), 199-211. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04647.x.
- Dorsch, M., Lane, D., and Stackebrandt, E. (1992). Towards a phylogeny of the genus *Vibrio* based on 16S rRNA sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 42(1), 58-63. doi: 10.1099/00207713-42-1-58.
- Eddabra, R., Prévost, G., and Scheftel, J.-M. (2012). Rapid discrimination of environmental *Vibrio* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiol. Res.* 167(4), 226-230. doi: 10.1016/j.micres.2011.09.002.
- Emami, K., Askari, V., Ullrich, M., Mohinudeen, K., Anil, A.C., Khandeparker, L., et al. (2012). Characterization of bacteria in ballast water using MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS one* 7(6). doi: 10.1371/journal.pone.0038515.
- Erler, R., Wichels, A., Heinemeyer, E.-A., Hauk, G., Hippelein, M., Reyes, N.T., et al. (2015). VibrioBase: a MALDI-TOF MS database for fast identification of *Vibrio* spp. that are potentially pathogenic in humans. *Syst. Appl. Microbiol.* 38(1), 16-25. doi: 10.1016/j.syapm.2014.10.009.
- Evason, D.J., Claydon, M.A., and Gordon, D.B. (2001). Exploring the limits of bacterial identification by intact cell-mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12(1), 49-54. doi: 10.1016/S1044-0305(00)00192-6.
- Fujinami, Y., Kikkawa, H.S., Kurosaki, Y., Sakurada, K., Yoshino, M., and Yasuda, J. (2011). Rapid discrimination of *Legionella* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiol. Res.* 166(2), 77-86. doi: 10.1016/j.micres.2010.02.005.
- Gomez-Gil, B., Soto-Rodríguez, S., García-Gasca, A., Roque, A., Vazquez-Juarez, R., Thompson, F.L., et al. (2004). Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology* 150(6), 1769-1777. doi: 10.1099/mic.0.26797-0
- Gomez-Gil, B., Thompson, F., Thompson, C., and Swings, J. (2003). *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53(1), 239-243. doi: 10.1099/ijs.0.02430-0.

- Hazen, T.H., Martinez, R.J., Chen, Y., Lafon, P.C., Garrett, N.M., Parsons, M.B., et al. (2009). Rapid identification of *Vibrio parahaemolyticus* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(21), 6745-6756. doi: 10.1128/AEM.01171-09.
- Hernandez, G., and Olmos, J. (2004). Molecular identification of pathogenic and nonpathogenic strains of *Vibrio harveyi* using PCR and RAPD. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63(6), 722-727. doi: 10.1007/s00253-003-1451-z.
- Ina-Salwany, M., Al-saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F.A., Mohd-Aris, A., Amal, M., et al. (2019). Vibriosis in fish: a review on disease development and prevention. *J. Aquat. Anim. Health* 31(1), 3-22. doi: 10.1002/aah.10045.
- Janda, J.M., and Abbott, S.L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45(9), 2761-2764. doi: 10.1128/JCM.01228-07.
- Kazazić, S.P., Popović, N.T., Strunjak-Perović, I., Babić, S., Florio, D., Fioravanti, M., et al. (2019). Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry identification of *Vibrio (Listonella) anguillarum* isolated from sea bass and sea bream. *PLoS one* 14(11). doi: 10.1371/journal.pone.0225343.
- Kim, M., Oh, H.-S., Park, S.-C., and Chun, J. (2014a). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64(2), 346-351. doi: 10.1099/ijs.0.059774-0.
- Mougin, J., Roquigny, R., Travers, M.-A., Grard, T., Bonnin-Jusserand, M., and Le Bris, C. (2020a). Development of a *mreB*-targeted real-time PCR method for the quantitative detection of *Vibrio harveyi* in seawater and biofilm from aquaculture systems. *Aquaculture*, 735337. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735337.
- Novriadi, R. (2016). Vibriosis in aquaculture. *Omni-Akuatika* 12(1), 1-12. doi: 10.20884/1.oa.2016.12.1.24.
- Ruwandeeepika, H., Defoidt, T., Bhowmick, P., Shekar, M., Bossier, P., and Karunasagar, I. (2010). Presence of typical and atypical virulence genes in vibrio isolates belonging to the Harveyi clade. *J. Appl. Microbiol.* 109(3), 888-899. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04715.x.
- Santos, I.C., Hildenbrand, Z.L., and Schug, K.A. (2016). Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. *Analyst* 141(10), 2827-2837. doi: 10.1039/C6AN00131A.
- Schirmeister, F., Wieczorek, A., Dieckmann, R., Taureck, K., and Strauch, E. (2014). Evaluation of molecular methods to discriminate the closely related species *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii*. *Int. J. Med. Microbiol.* 304(7), 851-857. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.09.001.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P.K., and Viridi, J.S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* 6, 791. doi: 10.3389/fmicb.2015.00791.
- Thompson, C.C., Vicente, A.C.P., Souza, R.C., Vasconcelos, A.T.R., Vesth, T., Alves, N., et al. (2009). Genomic taxonomy of vibrios. *BMC Evol. Biol.* 9(1), 258. doi: 10.1186/1471-2148-9-258.
- Thompson, F.L., Iida, T., and Swings, J. (2004a). Biodiversity of vibrios. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68(3), 403-431. doi: 10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004.
- Usbeck, J.C., Kern, C.C., Vogel, R.F., and Behr, J. (2013). Optimization of experimental and modelling parameters for the differentiation of beverage spoiling yeasts by Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in response to varying growth conditions. *Food Microbiol.* 36(2), 379-387. doi: 10.1016/j.fm.2013.07.004.
- Valentine, N., Wunschel, S., Wunschel, D., Petersen, C., and Wahl, K. (2005). Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(1), 58-64. doi: 10.1128/AEM.71.1.58-64.2005.
- Vargha, M., Takáts, Z., Konopka, A., and Nakatsu, C.H. (2006). Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates. *J. Microbiol. Methods* 66(3), 399-409. doi: 10.1016/j.mimet.2006.01.006.
- Williams, T.L., Andrzejewski, D., Lay, J.O., and Musser, S.M. (2003). Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14(4), 342-351. doi: 10.1016/S1044-0305(03)00065-5.

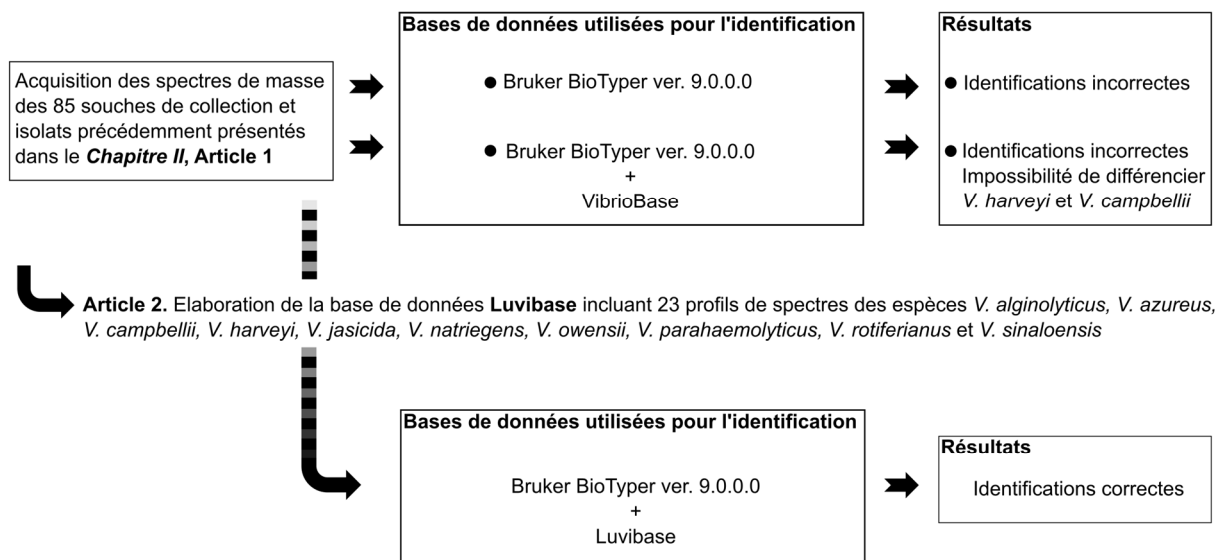
Supplemental data

Table S1. Species list and number of *Vibrio* strains included in the Bruker BioTyper database ver. 9.0.0.0.

Species	No. of strains in the Bruker database
<i>Vibrio aerogenes</i>	1
<i>Vibrio aestuarianus</i>	4
<i>Vibrio agarivorans</i>	1
<i>Vibrio albensis</i>	1
<i>Vibrio alginolyticus</i>	5
<i>Vibrio anguillarum</i>	7
<i>Vibrio brasiliensis</i>	1
<i>Vibrio campbellii</i>	1
<i>Vibrio chagasii</i>	1
<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	1
<i>Vibrio coralliilyticus</i>	1
<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	1
<i>Vibrio diazotrophicus</i>	6
<i>Vibrio ezuriae</i>	1
<i>Vibrio fluvialis</i>	3
<i>Vibrio fortis</i>	1
<i>Vibrio furnissii</i>	3
<i>Vibrio gazogenes</i>	1
<i>Vibrio gigantis</i>	1
<i>Vibrio harveyi</i>	7
<i>Vibrio hispanicus</i>	1
<i>Vibrio ichthyoenteri</i>	2
<i>Vibrio kanaloae</i>	1
<i>Vibrio lentus</i>	1
<i>Vibrio mediterranei</i>	2
<i>Vibrio metschnikovii</i>	2
<i>Vibrio mimicus</i>	1
<i>Vibrio mytili</i>	1
<i>Vibrio natriegens</i>	2
<i>Vibrio navarrensis</i>	5
<i>Vibrio neptunius</i>	1
<i>Vibrio nereis</i>	1
<i>Vibrio nigripulchritudo</i>	1
<i>Vibrio ordalii</i>	1
<i>Vibrio orientalis</i>	1
<i>Vibrio ostreicida</i>	3
<i>Vibrio pacinii</i>	1
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	9
<i>Vibrio pectenecida</i>	2
<i>Vibrio pelagius</i>	1
<i>Vibrio penaeicida</i>	1
<i>Vibrio pomeroyi</i>	1
<i>Vibrio ponticus</i>	1
<i>Vibrio proteolyticus</i>	1
<i>Vibrio rotiferianus</i>	1
<i>Vibrio ruber</i>	1
<i>Vibrio rumoiensis</i>	1
<i>Vibrio scophthalmi</i>	2
<i>Vibrio splendidus</i>	1
<i>Vibrio superstes</i>	1
<i>Vibrio tasmaniensis</i>	1
<i>Vibrio vulnificus</i>	11
<i>Vibrio xuii</i>	1
TOTAL	111

Schéma de synthèse

Objectif : Identifier les espèces appartenant au clade Harveyi de manière fiable par MALDI-TOF MS



Conclusion : La Luvibase, implémentée dans la base de données Bruker BioTyper, permet l'identification, fiable au niveau de l'espèce, des espèces appartenant au clade Harveyi. Cette base de données permet d'améliorer l'identification des isolats d'origine aquacole et plus particulièrement isolés d'Aquanord-Ichthus.

Figure 27 : Schéma de synthèse du Chapitre III, relatif au développement de la Luvibase, une base de données permettant l'identification par MALDI-TOF MS des espèces du clade Harveyi.

Chapitre IV.

Distribution spatiale et temporelle des Vibrionaceae et de l'espèce *Vibrio harveyi* dans un élevage aquacole de bars communs

Sommaire

1. Contexte	148
1.1. Aquanord-Ichtus en quelques chiffres.....	148
1.2. Le site d'élevage.....	148
1.3. La problématique de la vibriose sur Aquanord-Ichtus.....	149
2. Distribution spatiale et temporelle des <i>Vibrio</i> en milieu aquacole : Article 3	151
Article 3.....	153
Abstract.....	153
1. Introduction.....	154
2. Material and methods.....	156
3. Results.....	162
4. Discussion	170
5. Conclusion	174
References.....	175
Supplemental data	178
3. Etude préliminaire des capacités d'adhésion et de formation de biofilms	180
3.1. Tentative d'étude <i>in vitro</i> de formation de biofilms sur béton.....	180
3.2. Quantification relative de la formation de biofilm par coloration au cristal violet	181
3.3. Caractérisation du biofilm grâce au Biofilm Ring Test®	184
Schéma de synthèse	190

1. Contexte

1.1. Aquanord-Ictus en quelques chiffres

Aquanord-Ictus est une entreprise spécialisée dans le secteur piscicole, leader français de l'élevage de bars communs (*Dicentrarchus labrax*) et de daurades royales (*Sparus aurata*). Cette ferme aquacole, fondée en 1982, fait partie du groupe Gloria Maris, promoteur d'une aquaculture marine durable et de qualité. Aquanord-Ictus se situe à Gravelines (59) dans le Nord de la France, à proximité du site de la Centrale Nucléaire de Production d'Electricité (CNPE). Elle produit environ 1800 tonnes de poissons par an, avec un chiffre d'affaire de plus de 14 000 000 €. Cette ferme de grossissement, commercialise des bars de 300 g à 2,5 kg, âgés de 2 à 4 ans avec les labels Agriculture Biologique (AB) et *Friend of the Sea*, et les certifications Origine France Garantie et Charte Qualité-Aquaculture de nos régions®. Les alevins proviennent de l'Ecloserie marine de Gravelines Ictus située à proximité (Gloria Maris Groupe, 2020).

1.2. Le site d'élevage

Aquanord-Ictus est une exploitation de type intensive, semi-fermée pratiquant l'élevage en bassins en terre. Afin de maintenir la qualité de l'eau d'élevage (salinité, pH, évacuation des excréments...) ainsi qu'une température optimale pour la croissance du bar commun (idéalement 20 °C – 24 °C (Vázquez et Muñoz-Cueto, 2014)), les bassins sont alimentés par deux circuits d'eau de mer : une arrivée d'eau, dite froide, provenant de l'eau de mer environnante et une arrivée d'eau, dite chaude, provenant du système de refroidissement des réacteurs de la CNPE. L'eau des bassins est un mélange contrôlé de ces deux arrivées d'eau. L'hiver, la proportion d'eau provenant du canal d'eau chaude sera plus importante qu'en été, période au cours de laquelle les bassins sont uniquement alimentés par le canal d'eau froide. Ces informations sont résumées dans la Figure 28.

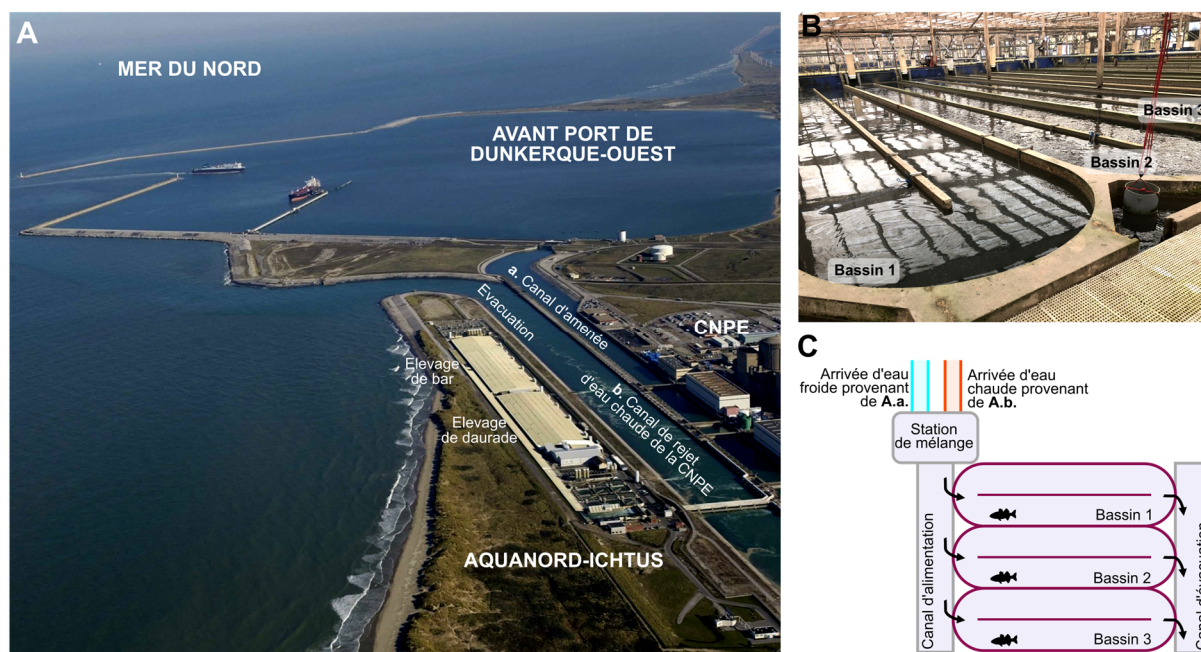


Figure 28 : Implantation et fonctionnement de la ferme aquacole Aquanord-Ichtus sur le site de Gravelines. A. Photographie aérienne de la ferme Aquanord-Ichtus (CNPE : Centrale Nucléaire de Production d'Electricité). B. Photographie des 3 bassins d'élevage utilisés lors de l'étude. C. Schéma du fonctionnement d'un module d'élevage sur Aquanord-Ichtus. Le canal d'alimentation est un mélange contrôlé d'eau chaude, provenant du canal de rejet de la CNPE (A.b.) et d'eau froide, provenant du canal d'amenée (A.a.), l'eau du canal d'évacuation est rejetée dans la mer du Nord.

1.3. La problématique de la vibriose sur Aquanord-Ichtus

Les bactéries du genre *Vibrio* et plus particulièrement les espèces *Vibrio anguillarum* et *Vibrio harveyi* sont responsables d'épisodes récurrents de vibriose sur Aquanord-Ichtus lors des périodes estivales. Ces épisodes entraînent une mortalité massive des bars communs ainsi qu'une perte économique considérable. Le risque de déclenchement de vibriose, liée à *V. anguillarum*, est aujourd'hui globalement contrôlé grâce à l'administration d'un vaccin commercial par voie intrapéritonéale. En revanche, à ce jour, aucun vaccin permettant de lutter contre *V. harveyi* n'est disponible sur le marché. Pour pallier cette absence, Aquanord-Ichtus utilise un auto-vaccin administré par voie intrapéritonéale, mis au point à partir de souches de *V. harveyi* pathogènes, isolées à partir de rates de poissons moribonds, lors de précédents épisodes de vibriose. Cet auto-vaccin est renouvelé chaque année en fonction de l'occurrence de nouvelles souches pathogènes. Ces vaccins sont donc d'efficacité variable et il est fréquent d'observer un épisode de vibriose

lorsque les juvéniles sortent de couverture vaccinale, c'est-à-dire en général lorsqu'ils atteignent environ plus de 200 g. De plus, les vaccins ne sont administrés que chez les individus de plus de 60 g du fait de la fragilité et de la difficulté de manipuler des poissons de petite taille. Les individus de moins de 60 g et de plus de 200 g ne sont donc pas protégés contre la vibriose. En cas de déclenchement d'un épisode, le débit d'eau dans les bassins est augmenté afin de renouveler l'eau et de purifier l'environnement. En cas d'échec et en dernier recours, l'antibiotique oxytétracycline est administré par voie orale, en l'intégrant dans les aliments.

Les bactéries du genre *Vibrio* sont ubiquitaires du milieu aquatique. Il n'est donc pas surprenant de les retrouver sur Aquanord-Ichtus. Néanmoins, selon les données issues du plan de surveillance de la CNPE, en 2018, les bactéries cultivables appartenant au genre *Vibrio* étaient 38 fois plus abondantes au point de rejet (canal d'évacuation de la ferme aquacole + canal de rejet d'eau chaude de la CNPE) par rapport au canal d'amenée (eau de mer issue de l'environnement naturel) (Antajan *et al.*, 2019). Cette différence peut, en partie, s'expliquer par la hausse de la température de l'eau (+ 10 °C) traversant la CNPE, favorisant la multiplication des bactéries du genre *Vibrio*. Ceci signifie que l'alimentation en eau chaude de la ferme aquacole, pourrait être une source probable de bactéries potentiellement pathogènes pour le bar commun. Cette augmentation peut aussi s'expliquer par l'activité de la ferme. Les bactéries pourraient se multiplier dans les bassins d'élevage, riches en nutriments. Une autre hypothèse serait que les bactéries du genre *Vibrio* sont des bactéries résidentes au sein de la ferme, sous forme de biofilms. Les bactéries incorporées dans un biofilm sont plus résistantes aux flux environnementaux, antibiotiques et désinfectants. Il a d'ailleurs été prouvé que l'espèce *V. harveyi* est capable de former des biofilms sur le béton (Karunasagar *et al.*, 1996). Les biofilms peuvent donc induire une persistance des souches potentiellement pathogènes sur Aquanord-Ichtus. L'abondance de bactéries du genre *Vibrio* potentiellement pathogènes dans le canal d'alimentation d'eau chaude, dans les bassins et dans les biofilms formés sur les parois des bassins en béton pourraient donc induire un risque pour le bar commun.

La gestion du risque lié à l'espèce *V. harveyi* et aux autres espèces potentiellement pathogènes, implique la compréhension de leur dynamique au sein de la ferme aquacole Aquanord-Ichtus. Pour cela, une étude quantitative est nécessaire afin de caractériser l'évolution spatiale et temporelle de leur abondance. Une étude qualitative est également indispensable afin d'identifier une évolution de la diversité des populations bactériennes et plus particulièrement des Vibrionaceae. Enfin, les causes de ces évolutions doivent ensuite être considérées au travers d'une étude des corrélations impliquant différents facteurs environnementaux biotiques et abiotiques.

2. Distribution spatiale et temporelle des *Vibrio* en milieu aquacole : Article 3

Statut de l'article Soumis dans *Aquaculture* (IF : 3,224)

Objectif de l'étude Evaluer le risque *Vibrio* au sein de la ferme aquacole Aquanord-Ichtus par l'étude de la distribution spatiale et temporelle des Vibrionaceae cultivables à 37 °C et plus particulièrement de *V. harveyi*, ainsi que par l'étude de l'impact de différents facteurs environnementaux biotiques et abiotiques.

Démarche expérimentale Une campagne d'échantillonnage a été entreprise d'avril à octobre 2018 sur Aquanord-Ichtus. L'étude portait sur les arrivées d'eau alimentant toute la ferme : l'eau froide provenant de l'environnement naturel et l'eau chaude provenant du système de refroidissement de la CNPE, ainsi que sur 3 bassins d'élevage identiques, faisant figure de triplicatas. Deux types d'échantillons ont été collectés en triplicatas comme détaillé dans le *Chapitre I*: (i) des échantillons d'eau provenant des arrivées d'eau et des bassins, collectés chaque semaine, (ii) ainsi que des échantillons de biofilms, collectés toute les deux semaines, provenant des bassins et plus particulièrement du dispositif d'échantillonnage mis au point dans le *Chapitre I* (pour cela 100 morceaux de béton ont été immergés dans chaque bassin). Un total de 609 échantillons a été collecté avec 465 échantillons d'eau et 144 échantillons de biofilms. Ces derniers ont été analysés grâce aux méthodes mises au point dans les *Chapitre II, Article 1* et

Chapitre III, Article 2. La PCR en temps réel a permis de déterminer l'abondance de *V. harveyi* dans chaque compartiment étudié au cours du temps. La technique de MALDI-TOF MS, ainsi que l'utilisation de la base de données Bruker BioTyper ver. 9.0.0.0 implémentée avec la Luvibase ont permis d'identifier les bactéries isolées sur TCBS à 37 °C, température de croissance de la plupart des espèces du clade Harveyi. Enfin, une étude des corrélations intégrant différents facteurs environnementaux a été réalisée afin d'identifier les éléments influençant les évolutions de l'abondance de *V. harveyi* et des Vibrionaceae cultivables à 37 °C.

Résultats principaux Des espèces potentiellement pathogènes pour le bar commun (*Photobacterium damsela*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. owensii* et *V. rotiferianus*) subsistent au sein de la ferme, pendant une grande partie de l'année, non seulement sous forme planctonique mais également sous forme de biofilms. Ces espèces sont présentes à la fois dans les arrivées d'eau et dans les bassins. L'analyse des corrélations, intégrant différents facteurs environnementaux, a permis de déceler une corrélation entre la température et l'abondance de *V. harveyi* ou plus généralement des Vibrionaceae cultivables à 37 °C, non seulement dans l'eau d'élevage mais également dans les biofilms.

Conclusion La présence du principal agent pathogène *V. harveyi* tout au long de l'année, au sein de la ferme aquacole représente un risque constant pour le bar commun. Le contrôle et l'éradication de cet agent s'avèrent potentiellement difficiles, à cause de la présence de *V. harveyi* sous forme de biofilms, pouvant conférer une résistance accrue aux antibiotiques et désinfectants, et induisant ainsi une persistance de souches potentiellement pathogènes dans les bassins. Le risque lié à *V. harveyi* pourrait augmenter au cours des années à venir, en raison d'une augmentation de la température de l'eau, liée au réchauffement climatique.

Article 3

Abundance and spatial patterns over time of Vibrionaceae and *Vibrio harveyi* in water and biofilm from a seabass aquaculture facility

Julia Mougin^a, Roxane Roquigny^a, Christophe Flahaut^a, Maryse Bonnin-Jusserand^a, Thierry Grard^a and Cédric Le Bris^a

^a Univ. Littoral Côte d'Opale, UMR 1158 BioEcoAgro, Institut Charles Viollette, USC ANSES, INRAe, Univ. Artois, Univ. Lille, Univ. Picardie Jules Verne, Univ. Liège, Yncréa, F-62200 Boulogne-sur-Mer, France

Keywords: Aquaculture, *Dicentrarchus labrax*, MALDI-TOF MS, *Vibrio harveyi*, Vibrionaceae, real-time PCR

Abstract

One of the major threats to the seabass (*Dicentrarchus labrax*) aquaculture sector is the development of vibriosis, a disease caused mainly by bacteria from the family Vibrionaceae, especially *Vibrio harveyi*. This disease can result in important economic losses or severe public health problems. Furthermore, bacteria can form biofilms on the walls of aquaculture tanks, leading to the persistence of potentially pathogenic bacteria on fish farms. Given the relationship between abundance in the surrounding environment and prevalence in fish, monitoring the presence of *V. harveyi* in rearing water and biofilms over time may help better understand the dynamics of the pathogen and factors that increase the risk of vibriosis outbreaks.

In this study, the dynamics and spatial patterns of cultivable Vibrionaceae and *V. harveyi* in water and biofilms from rearing tanks and in the cold- and hot-water inlets supplying the farm were monitored for 7 months. Several potential seabass pathogens were isolated:

Photobacterium damsela, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio owensii* and *Vibrio rotiferianus*. However, *V. harveyi* remained the most problematic pathogen. Its relatively constant presence in water and biofilm samples throughout the sampling campaign represents a risk for vibriosis outbreaks. Moreover, the correlation between water temperature and the abundance of *V. harveyi* suggests that the risk fluctuates throughout the year. Obtaining qualitative data regarding the relative diversity of viable culturable Vibrionaceae and quantitative data on the abundance of *V. harveyi* over time in a seabass aquaculture facility is the essential first step for designing new solutions to manage vibriosis.

1. Introduction

In the context of rapid world population growth and the steep decline in marine fisheries catches, the development of aquaculture is of significant interest for ensuring global food security and the conservation of wild marine stocks. In Europe, seabass (*Dicentrarchus labrax*) is currently one of the most farmed fish species and this high-value species is heavily traded (Bostock *et al.*, 2016, FAO, 2018). Bacterial diseases such as pasteurellosis (*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*), photobacteriosis (*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*), tenacibaculosis (*Tenacibaculum* spp.), and vibriosis (*Vibrio* spp.) represent severe threats to the seabass aquaculture sector (Buchmann *et al.*, 2009, Muniesa *et al.*, 2020). They may not only result in mass mortality events and highly negative economic effects, but are also potential zoonotic sources and may pose a risk for human health (Austin, 2010).

Among them, vibriosis, caused by certain species of *Vibrio*, stand as the most significant disease, affecting seabass at all stages of production chain (Le Breton, 1999, Pujalte *et al.*, 2003, Korun *et Timur*, 2008, Muniesa *et al.*, 2020). This disease is characterized by anorexia, erratic swimming behavior, exophthalmos, darkening of body color, pale gills, hemorrhages, ulcers, and skin lesions (Korun *et Timur*, 2008). Several *Vibrio* species have been reported in seabass infections: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio ordalii*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* (Ghittino *et al.*, 2003, Kahla-Nakbi *et al.*, 2006, Korun *et Timur*, 2008, Khouadja *et al.*, 2013). *Vibrio anguillarum* has been the main significant seabass pathogens for

decades (Vázquez et Muñoz-Cueto, 2014). Commercially available prophylactic strategies, such as vaccines, have thus been extensively developed and effectively applied (Dadar et al., 2017). However, *V. harveyi* has recently been identified as an emerging major concern for seabass aquaculture and, to date, there are no specific, effective prophylactic control measures (Vendramin et al., 2016, Dadar et al., 2017).

Vibrio harveyi is a Gram-negative bacterium, ubiquitous in the marine environment, particularly in temperate and tropical waters. This species can be found in a free-swimming state, in biofilms attached to biotic and abiotic surfaces, or in symbiotic and host-pathogen interactions (Montánchez et Kaberdin, 2019). Importantly, *V. harveyi* can be pathogen for a wide range of cultivated hosts, including crustaceans, mollusks or fishes (Austin et Zhang, 2006). Its occurrence is likely to increase due to global warming and may lead to further *V. harveyi*-associated infections and have devastating effects for the aquaculture sector (Vezzulli et al., 2015). Interestingly, vibriosis outbreaks in seabass farms exhibit strong seasonality and are more likely to occur from June to November, when the water temperature is maximal (Pujalte et al., 2003). Warmer temperatures may indeed increase the abundance of viable *V. harveyi* in the surrounding environment and thus increase the prevalence of *V. harveyi* in fish (Kim et Lee, 2017). Importantly, contamination of fish usually occurs through contact with contaminated water *via* the digestive tract or skin (O'Toole et al., 2004). Although the development of a disease arises from the contamination of fish, the abundance of the pathogen in the surrounding environment may be an indicator of the risk of vibriosis. Other environmental factors such as salinity, fish density, pH, or the susceptibility and physiological state of the host, may have an impact on the development of vibriosis (Snieszko, 1974, Prayitno et Latchford, 1995, Vazzana et al., 2002, Maulvault et al., 2018). Moreover, biofilm formation on the walls of rearing tanks may enhance the risk of vibriosis outbreaks. Biofilms can facilitate resistance to antibiotics, and water sanitizers and may induce the persistence of potentially pathogenic bacteria in the aquaculture facility (Karunasagar et al., 1996, Bourne et al., 2006). Thus, the release of *V. harveyi* from biofilms in the rearing water or the contact of fish with the walls of aquaculture tanks may increase the prevalence of bacteria in fish and increase the risk of vibriosis outbreaks.

Therefore, monitoring the abundance of *V. harveyi* in the surrounding environment, such as in the rearing water and biofilms, may be an indicator of the *V. harveyi* contamination of seabass and thus of the probability of vibriosis outbreaks. Moreover, greater understanding of the correlation between the abundance, dynamics, and spatial patterns of *V. harveyi* and environmental biotic and abiotic factors might help to control vibriosis in aquaculture facilities.

Here, we report the dynamics and spatial patterns of cultivable Vibrionaceae and *V. harveyi*, monitored in 2018 from April to October (months when vibriosis is most likely to strike). The study was conducted on a semi-closed seabass farm, located in Northern France. The bacterial abundance and relative diversity were determined from water and biofilm in rearing tanks, and in the cold- and hot-water inlets supplying the farm. The dynamics of cultivable Vibrionaceae was assessed by culturing them on selective media at 37 °C. Presumptive cultivable Vibrionaceae were then identified using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) using an in-house database, called Luvibase, previously and specifically designed to identify *Vibrio* species from the Harveyi clade (Mougin *et al.*, 2020b). The abundance of *V. harveyi* was estimated using a *mreb*-targeted real-time PCR (Mougin *et al.*, 2020a). Environmental parameters and fish density and/or mortality were recorded through the sampling campaign to identify the environmental factors that best correlate with bacterial abundance. Overall, the objective was to gain a greater understanding regarding the dynamics over time and spatial pattern of potentially pathogenic bacteria for seabass. This understanding can help design prophylactic measures to better manage vibriosis outbreaks.

2. Material and methods

2.1. Sampling site

This study was conducted from April to October 2018 in Aquanord Ichthus, a fish farm located in Gravelines, France along the southwestern coast of the North Sea. Because the aquaculture system is situated near a nuclear power plant, the site is monitored annually in order to detect any abnormalities in the development of the natural marine environment (Antajan *et al.*, 2019).

The farm is an intensive semi-closed system managed by a private company. This company currently raises seabass (*Dicentrarchus labrax*) and seabream (*Sparus aurata*) during the on-growing phase in flow-through tanks constructed from concrete. The water supply is regulated *via* two water inlets: a “cold-water inlet” from the natural marine environment and a “hot-water inlet” from the cooling system of a nuclear power plant nearby (Fig. 1). Water flow into the rearing tanks is regulated using a valve to maintain uniform water quality and temperature through the year. Overall, from mid-July to mid-September, the rearing tanks are supplied by the cold-water inlet only. During the rest of the year, the rearing tanks are supplied by both cold- and hot-water inlets. Fish are fed daily and aeration is provided to maintain an optimal level of dissolved oxygen (DO). Farmers use a commercial vaccine against *V. anguillarum* and an annual autogenous vaccine against *V. harveyi*. The latter is developed annually from pathogens isolated from the spleens of moribund fish during previous outbreaks.

Three similar rearing tanks were chosen for this study. The water capacity of each tank was 75 m³, with a water column of 1.3 m and a holding capacity of around 30 000 seabass. Average fish stock density was 48.13 kg.m⁻³, with an average fish weight of 200 g. During the sampling campaign, the aquaculture facility provided weekly biomass and mortality data from each rearing tank.

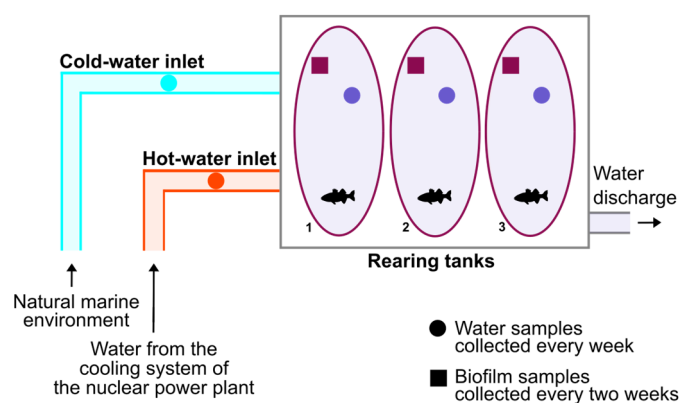


Figure 1. Schematic representation of the sampling areas on the fish farm, illustrating the sampling compartments and types of samples collected. The water samples were collected in the rearing tanks, and in the cold- and hot-water inlets every week. The biofilm samples were collected in the rearing tanks every two weeks.

2.2. Sample collection and environmental parameters

Two types of samples, water and biofilm, were collected from three tanks containing seabass and from the cold- and hot-water inlets. Water samples were collected weekly from tanks and hot- and cold-water inlets. Biofilm samples were collected every two weeks from tanks. Both types of samples were harvested as previously detailed in [Mougin *et al.* \(2020a\)](#). Briefly, a volume of 1 L of water was collected in a sterile bottle in triplicate, from both water inlets and from the three rearing tanks, just below the surface of the water. Pieces of concrete, made of the same material used to build the tanks and placed 20 cm below the surface of the water, were collected in triplicate from the three rearing tanks (Supplementary Fig. 1). Samples were maintained on ice during transport to the laboratory. A total of 465 water samples and 144 biofilm samples were thus collected during the sampling campaign.

During sample collection, water temperature, pH, salinity, and conductivity were measured in each tank and in both inlets, within 50 cm of the water surface using a multi-parameter probe (Odeon Open X, Aqualabo, Champigny-sur-Marne, France). DO concentration was also measured in rearing tanks only using a Handy Polaris DO meter (OxyGuard, Farum, Denmark).

2.3. Sample preparation

Samples were processed as previously described in [Mougin *et al.* \(2019\)](#) and [Mougin *et al.* \(2020a\)](#). Briefly, water samples were filtered through 0.45 µm pore-size nitrocellulose filters (Sartorius, Göttingen, Germany). Filters were then immersed in 25 mL of Luria-Bertani broth supplemented with 20% NaCl (LBS) and 20% glycerol, and stored at -80 °C until analysis. Biofilms from the concrete samples were collected using a homemade sterile stainless steel jig by swabbing with two 2.34 cm² swabs. The swabs (150C, Copan, Brescia, Italy) were then immersed in 3 mL of LBS with 20% glycerol and stored at -80 °C until analysis. Subsequently, both types of samples were defrosted at room temperature and vortexed for 3 min to dislodge bacteria from the filters and swabs. Filters and swabs were removed the LBS-glycerol solution and the liquid was

centrifuged at $8000\times g$ for 10 min. The cell pellets were then dissolved in 3 mL of physiological water (0.9% NaCl) and centrifuged at $8000\times g$ for 10 min. Supernatants were removed and the cell pellets were dissolved in 2 mL of physiological water. Samples were then split into two subsamples. One subsample of 1800 μL was used to quantify *V. harveyi* using real-time PCR. The other 200 μL subsample was used for relative quantification and identification of presumptive cultivable Vibrionaceae by plating on selective agar media and by MALDI TOF MS.

2.4. Quantification of *V. harveyi* using real-time PCR

The 1800 μL subsample was centrifuged at $8000\times g$ for 10 min and the supernatant was removed. Total DNA was extracted from the cell pellet, using the DNeasy PowerBiofilm kit (Qiagen, Hilden, Germany) in accordance with manufacturer's protocol, selected according to Mougín *et al.* (2020a). Relative quantification of *V. harveyi* based on a standard curve was performed according to the previously optimized real-time PCR protocol in Mougín *et al.* (2020a), using *V. harveyi*-specific primers targeting the *mreB* gene (synthesized by TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Germany). Briefly, pure DNA of the collection strain *V. harveyi* LMG 4044 was extracted using the DNeasy Blood&Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany). Purity was verified on a DeNovix DS-11 spectrophotometer (UV spectroscopy, Clinisciences, Nanterre, France) and the quantity was determined using a Qubit 3.0 fluorometer (dsDNA High-Sensitivity assay), (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Then, standard curves were generated from a series of 10-fold dilutions of pure DNA of the collection strain *V. harveyi* LMG 4044. For each assay, the calibration curve was plotted using the means of the threshold cycle (C_T) values from two replicate series versus the logarithm of each dilution factor. Each extracted environmental DNA template was analyzed at a 10-fold dilution to avoid the effects of real-time PCR inhibitors. Genome copy equivalent (GE) concentrations were then estimated, taking the dilution factor into account. All quantitative PCR reactions were run on a LightCycler[®] 480 (Roche Diagnostics, France) with a positive control (LMG 4044 *V. harveyi* DNA), a negative control (CIP 70.67 *V. campbellii* DNA), and a no template control (NTC), DNA-free. Melting curve analysis was performed to confirm the specificity of the fluorescent signals. Each extracted environmental DNA template was analyzed at least twice to ensure robust measurements.

2.5. Quantification of presumptive Vibrionaceae and identification using MALDI-TOF MS

An aliquot of 100 μL from the second subsample was plated on thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). The remaining 100 μL was serially 10-fold diluted in physiological water (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) and 100 μL of each dilution was plated onto TCBS agar. All plates were then incubated at 37 °C overnight. Presumptive cultivable Vibrionaceae colony forming units (CFUs) were counted using a Scan 500 plate reader (Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, France) and the concentration in each sample was estimated taking the dilution factor into account. Different colony morphotypes were screened on the basis of color (green or yellow), color shade, size, circumference (smooth or irregular) and presence/absence of a halo within 10 min after removal from the incubator. One colony of each different morphotype was randomly selected and incubated on LBS agar at 37 °C overnight. The morphological features of each selected colony were recorded. Pure bacteria were stocked in LBS broth supplemented with 20% glycerol at -80 °C until identification using MALDI-TOF MS.

Subsequently, once defrosted, these bacterial isolates were subcultured on marine agar (MA), (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) and incubated for 24 h, at 37 °C. Then, a single colony was plated on MA (Difco Laboratories) and incubated 24 h, at 37 °C to ensure the purity of the isolate. Preparation of bacterial extracts, target-loading and acquisition of MALDI-TOF MS profiles were performed as previously described in [Mougin *et al.* \(2020b\)](#). Briefly, the cellular proteins of each bacterial isolate were extracted from bacterial cells according to manufacturer's recommendations (Bruker France, Wissembourg, France). The extracts were stored at -20 °C until use. Then, 1 μL of the supernatant from each protein extract was deposited onto a clean 384-target ground steel microtiter plate (Bruker France) in four replicates. After air drying, 1 μL of a 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ matrix solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) in 50% acetonitrile and 2.5% trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was overlain on each spot. MALDI-TOF MS analysis was performed using an Autoflex Speed™ (Bruker France), running Flexcontrol ver. 3.4 software (Bruker France). The Bruker bacterial test standard (BTS, Bruker

France) was used to calibrate the mass spectrometer before each run, according to the manufacturer's recommendations. Mass spectra were acquired in the positive linear ion mode across a mass/charge (m/z) ratio of 2000-20,000 Da. Mass spectra were acquired using the manufacturer's automatic MBT_FC.par method. For each MALDI-TOF MS profile, mass spectra were obtained from 5000 laser shots in 1000 shot steps performed randomly from different areas of the spot. Each MALDI-TOF MS profile was first compared with the mass spectra profiles (MSPs) of the Bruker BioTyper database ver. 9.0.0.0 implemented with the Luvibase, a supplemental, in-house *Vibrio* database (Mougin *et al.*, 2020b). The degree of concordance between experimental MALDI-TOF MS profiles and the MSPs was evaluated using a log-score calculated using the MALDI BioTyper Compass Explorer ver. 4.1 (Bruker France). A log-score exceeding 2.3 indicated a highly probable identification at the species level; a log-score between 2.0 and 2.3 indicated a probable identification at the species level; a log-score between 1.7 and 2.0 indicated a probable identification at the genus level only; and a log-score below 1.7 indicated no significant similarities between MSPs included in the databases and the unknown profile.

2.6. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using RStudio ver. 3.5.2 software (R Core Team, 2013). Variation in bacterial abundance and environmental parameters were analyzed for each tank and inlet separately. A Kruskal-Wallis test for multiple comparisons and a Wilcoxon test for pairwise comparisons were used to analyze bacterial abundance between the three tanks and the hot- and cold-water inlets. A generalized linear mixed model with a random effect on time was used to reveal correlations between selected environmental factors: temperature, pH, salinity, conductivity, DO, fish data (i.e. biomass and mortality) and bacterial abundances. The models were constructed using the function lme in the nlme package ver. 3.1-137 (Pinheiro *et al.*, 2018) by excluding non-significant parameters or interactions one by one, starting with the interaction terms. For all tests, a p-value < 0.05 was considered statistically significant. All graphics were drawn using the ggplot2 packages ver. 2.2.1 (Wickham, 2016).

3. Results

3.1. Water quality and fish density and mortality

The values of the parameters describing water quality and fish density and mortality recorded from April to October 2018 are given in Table 1. In the cold-water inlet, the average temperature was 16.4 ± 3.5 °C and values fluctuated widely with a minimum of 9.1 °C, in April, and a maximum of 21.1 °C, in August. The pH, salinity, and conductivity did not vary widely and were 7.9 ± 0.3 , 34.2 ± 0.4 and 51.9 ± 0.6 ms.cm⁻¹, respectively. In the hot-water inlet, average temperature was 23.8 ± 1.3 °C and values did not fluctuate widely, with a minimum of 19.9 °C in April and a maximum of 25.7 °C in September. The pH, salinity, and conductivity did not fluctuate widely either and were 7.9 ± 0.3 , 34.6 ± 0.5 and 52.5 ± 0.7 ms.cm⁻¹ respectively. Temperature, pH, salinity and conductivity were similar among rearing tanks; the values were thus averaged. Average temperature was 19.1 ± 1.0 °C, with a minimum of 17.9 °C in April and a maximum of 21.1 °C in August. The pH, salinity, and conductivity did not vary widely and were 7.5 ± 0.3 , 34.4 ± 0.5 and 52.3 ± 0.5 ms.cm⁻¹ respectively. During the sampling campaign, batches of fish were removed and replaced once from Tank 1 and once from Tank 2, due to their growing size. The average DO concentration in the rearing tanks was maintained at 6.05 ± 1.2 mg.L⁻¹. The mortality rate was low throughout the sampling campaign and no vibriosis outbreak was recorded in the three chosen rearing tanks.

Table 1. Means of parameters recorded from April to October 2018 in the aquaculture facilities.

Sampling months	Temperature (°C)			pH			Salinity			Conductivity (ms.cm ⁻¹)			Dissolved oxygen (mg.L ⁻¹)			Fish density (kg.m ⁻³)			Fish mortality per week (%)		
	Cold-water inlet	Hot-water inlet	Rearing tanks	Cold-water inlet	Hot-water inlet	Rearing tanks	Cold-water inlet	Hot-water inlet	Rearing tanks	Cold-water inlet	Hot-water inlet	Rearing tanks	Tank 1	Tank 2	Tank 3	Tank 1	Tank 2	Tank 3	Tank 1	Tank 2	Tank 3
April	10.2	21.4	18.1	8.1	8.0	7.8	33.8	33.8	34.1	51.5	51.6	51.9	7.2	5.8	7.1	28.3	54.5	31.8	0.02	0.13	0.04
May	13.2	24.0	18.8	8.1	8.0	7.8	34.2	34.6	34.4	51.9	52.6	52.2	7.1	7.0	5.8	37.2	28.5*	34.2	0.01	0.02	0.01
June	17.0	24.3	19.2	7.8	7.9	7.5	34.1	34.6	34.2	51.9	52.5	52.0	5.9	5.4	5.4	42.8	39.5	37.5	0.00	0.08	0.29
July	20.0	24.1	20.2	7.8	7.8	7.4	33.8	34.1	33.9	51.5	51.9	51.6	5.6	5.5	5.4	52.5	47.0	35.5	0.01	0.01	0.04
August	20.3	24.0	20.4	8.0	7.9	7.5	34.5	34.6	34.8	52.3	52.5	52.4	6.1	6.4	5.5	54.0	55.8	43.6	0.03	0.04	0.06
September	18.0	24.1	18.4	8.1	8.0	7.4	34.4	35.4	34.9	52.2	53.6	53.0	6.4	5.4	5.6	62.8	67.0	53.0	0.02	0.01	0.04
October	15.8	24.7	18.5	7.7	7.7	7.1	34.6	34.8	34.6	52.5	52.8	52.6	7.5	5.0	5.7	51.3*	74.8	59.0	0.06	0.01	0.04

*The on-growing batch of fish was removed and transported to a new rearing tank more suitable for their size, and a new batch of fish of smaller size was put in the rearing tank used in this study

3.2. Identification of presumptive Vibrionaceae isolates cultured on TCBS agar

Across all the compartments, from April to October 2018, 1009 isolates were chosen on the basis of morphological traits on TCBS agar, after incubation at 37 °C for 24 h. Overall, 80.4% (811/1009) of the isolates were collected from the three rearing tanks: 44.2% (446/1009) originated from rearing water and 36.2% (365/1009) originated from biofilms. Only 11.5% (116/1009) and 8.1% (82/1009) were collected from the hot- and cold-water inlets, respectively (Fig. 2.a).

These isolates were then identified using MALDI-TOF MS with the Bruker BioTyper ver. 9.0.0.0 database supplemented with our in-house *Vibrio* Luvibase. This analysis resulted in the assignment of 91.2% (920/1009) of the isolates at the species level ($\log\text{-score} \geq 2.0$) and 8.8% (89/1009) at the genus level only ($1.7 \leq \log\text{-score} < 2.0$) (Fig. 2.b). Among the 920 isolates identified at the species level, 75.7% belonged to genus *Vibrio* and 24.3% to *Photobacterium*. Within the *Photobacterium* genus, only *P. damsela* was isolated. Within the *Vibrio* genus, the isolates were categorized into four clades, the Harveyi clade (97.3%), the Splendidus clade (2.0%), the Orientalis clade (0.6%) and the Coralliilyticus clade (0.1%). The Harveyi clade consisted of isolates assigned to *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. owensii*, *V. rotiferianus*, *V. jasicida*, *V. mytili*, *V. campbellii* and *V. parahaemolyticus*. The Splendidus clade consisted of isolates identified as *V. pelagius* and *V. fortis*. The Orientalis clade consisted of isolates assigned to *V. brasiliensis*, and *V. sinaloensis*. The Coralliilyticus clade consisted of one isolate assigned to *V. coralliilyticus*. Overall, the most frequently identified species were *V. alginolyticus* (24.8%), *P. damsela* (24.3%), *V. harveyi* (24.2%) and *V. owensii* (15.8%) (Fig. 2.b). All other species were very scarce.

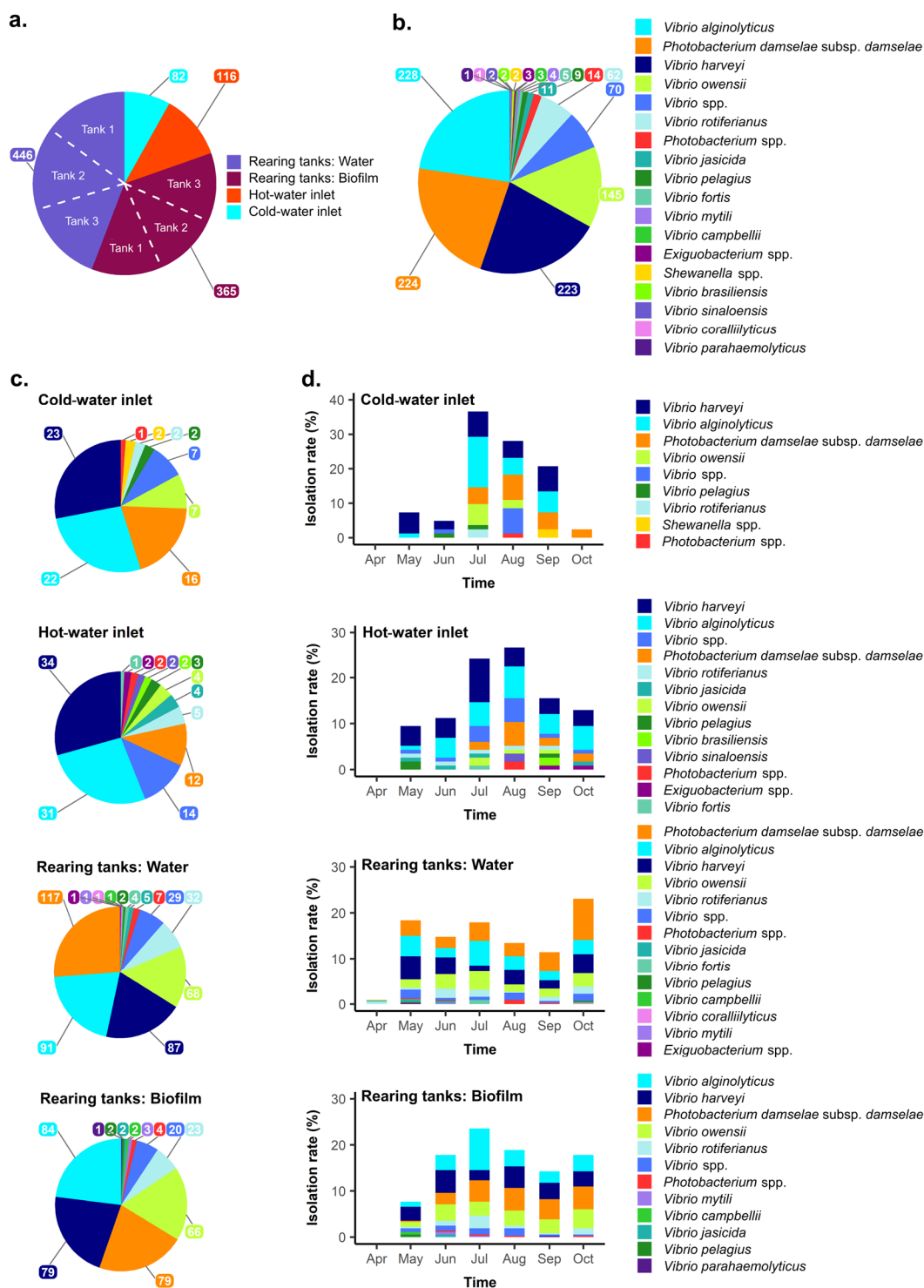


Figure 2. Qualitative analysis of the distribution and identification of the 1009 isolates (TCBS agar, 37 °C), using MALDI-TOF MS. a. Relative proportions of the isolates collected from the different sampling sites: rearing tanks and hot-/cold- water inlets and different sample types: water and biofilm. b. Relative proportions of identified species regardless of the sampling site and sample type. c. Relative proportions of identified species in the different sampling sites and sample types. d. Identified species in the different sampling sites and sample types throughout the sampling campaign, from April to October 2018. The key on the right indicates the color codes of the identified species, ranked from the most abundant (top) to the least abundant (bottom).

The relative isolated and identified bacterial diversity was roughly similar between the compartments and sample types (Fig. 2.c). Nevertheless, none of the species were isolated systematically throughout the sampling campaign (Fig. 2.d). *Vibrio alginolyticus* was recorded from May to October in the hot-water inlet, water tanks and biofilm, but was not recorded in June and October in the cold-water inlet. The presumed pathogen *V. harveyi* was recorded from May to September in all compartments. *Photobacterium damsela* was recorded from July to October in the hot- and cold-water inlets and from May to October in the water tanks and biofilms. Finally, *V. owensii* was recorded from May to October in water tanks and biofilms, but recorded from July to September in the hot-water inlet, and in July and August only in the cold-water inlet.

3.3. Quantification of presumptive culturable Vibrionaceae isolates

Presumptive culturable Vibrionaceae CFUs grown on TCBS agar, after incubation at 37 °C for 24 h, were enumerated and their abundance in each compartment and each sample was estimated. According to the statistical analysis, the average abundance of presumptive culturable Vibrionaceae differed significantly between the cold- and hot-water inlets and water from rearing tanks (each p-value < 0.05). In contrast, there were no significant differences between the average abundances of the three rearing tanks, for either the water or biofilm samples (each p-value > 0.05). Consequently, for the following analyses, for each sampling date, the average abundances detected in the three rearing tanks were pooled.

In the cold-water inlet, the presumptive detected culturable Vibrionaceae, ranged from 3.37×10^2 to 4.85×10^3 CFU.mL⁻¹ (Fig. 3.a). The maximum abundance was detected from July to September, when the temperature recorded in this compartment was the highest, 19.8 ± 1 °C. A peak in abundance (3.37×10^2 CFU.mL⁻¹) was observed in late May at a temperature of 15.0 °C, and water temperature continued to increase slightly (average + 0.7 °C each week from April to June). No bacteria were detected in October and April.

In the hot-water inlet, the presumptive detected culturable Vibrionaceae followed more or less the same pattern, ranging from 3.11×10^2 to 6.71×10^4 CFU.mL⁻¹ in abundance. Maximum abundance was detected in late June when the temperature reached 24 °C. Then, abundance tended to decrease slightly until mid-October, when a peak of 5.99×10^2 CFU.mL⁻¹ was detected at a temperature of 24.9 °C. As in the cold-water inlet, a peak in abundance (6.43×10^3 CFU.mL⁻¹) was detected in late May at a water temperature of 24.7 °C in this compartment.

In the rearing tanks, the presumptive culturable Vibrionaceae detected in water ranged from 2.28×10^3 to 1.74×10^5 CFU.mL⁻¹. Presumptive detected culturable Vibrionaceae were enumerated from mid-April until the end of the study. The abundance tended to increase slowly and constantly with an average + 0.20 log per week until August, the warmest month of summer with the maximum recorded temperature (21.7 °C). Subsequently, abundance decreased slightly in September, and hit a peak of 2.50×10^4 CFU.mL⁻¹ in mid-October, when the temperature jumped back to 19.1 °C. The presumptive attached culturable Vibrionaceae detected in biofilms ranged from 2.51×10^5 to 2.03×10^7 GE.cm⁻². Presumptive attached culturable Vibrionaceae were enumerated from mid-May until the end of the study. As observed in the water samples, abundance tended to increase slowly and constantly with an average + 0.27 log per week until August, then decreased slightly. Interestingly, a peak in the abundance of 2.29×10^6 GE.cm⁻² occurred with a peak in temperature in mid-October, similar to the pattern for the water samples and the hot-water inlet.

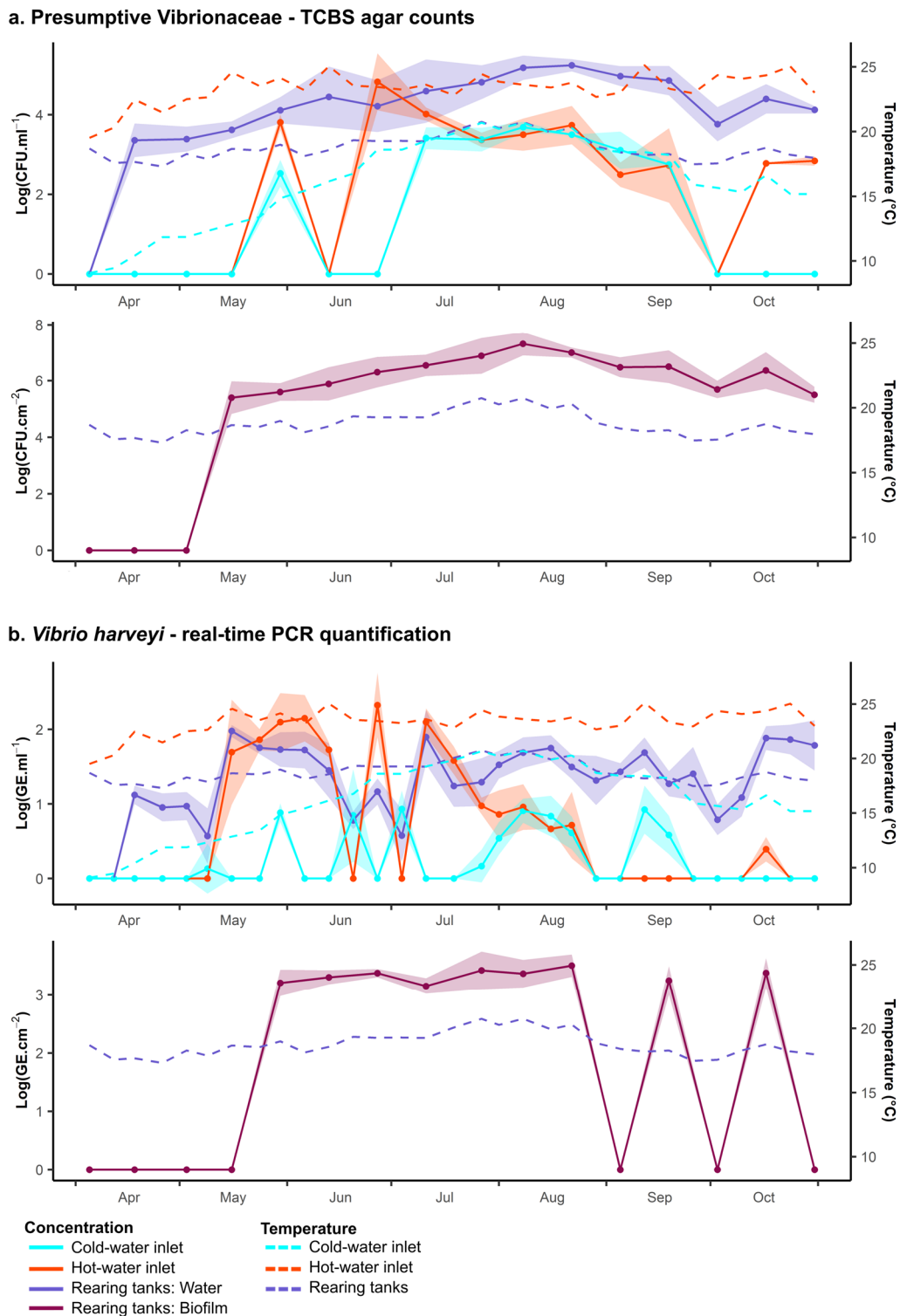


Figure 3. Fluctuation in abundance of a. presumptive culturable Vibrionaceae on TCBS agar, 37 °C, and b. *Vibrio harveyi* in the cold- and hot-water inlets, water and biofilm samples from rearing tanks. For inlet samples, abundance values are the mean of three samples, collected simultaneously. For rearing tanks, abundance values are the mean of nine replicates, corresponding to the three replicates collected simultaneously from each of the three rearing tanks. The area around the curves represent the 95% confidence intervals for the abundance index. Water temperature in all compartments are also shown.

3.4. Quantification of *V. harveyi* using real-time PCR

Real-time PCR was used to estimate the abundance of *V. harveyi* detected in each compartment and each sample. According to the statistical analysis, the average abundance of presumptive culturable Vibrionaceae detected in the water from the cold- and hot-water inlets and rearing tanks were significantly different (each p-value < 0.05). In contrast, there were no significant differences between the average abundances observed in the three rearing tanks, for either the water or biofilm samples (each p-value > 0.05). Consequently, for each sampling time, the average abundances detected in the three rearing tanks were pooled together.

Overall, the average estimated quantity of *V. harveyi* was higher in hot-water inlet than in the cold-water inlet. In the cold-water inlet, abundance of detected *V. harveyi*, ranged from 1.35 to 8.57 GE.mL⁻¹ (Fig. 3.b). A few peaks were detected in late May, mid-June, early July, and mid-September. Successive screenings for *V. harveyi* over 5 weeks demonstrated a rapid increase in abundance from mid-July to mid-August, when temperatures reached their highest values.

In the hot-water inlet, abundance of detected *V. harveyi* ranged from 4.62 to 2.11×10² GE.mL⁻¹. *V. harveyi* was first detected in mid-May when the temperature reached 25.1 °C for the first time in the year. Abundance increased slowly (average + 0.11 log per week) until early June when the concentration reached 1.41×10² GE.mL⁻¹, and then decreased. The average abundance detected in late June and mid-July was relatively high, with abundance decreasing slightly thereafter (average + 0.20 log per week), dropping to an absence of detection until a last peak of 4.62 GE.mL⁻¹ in mid-October when the temperature reached 24.9 °C.

In the rearing tanks, detected *V. harveyi* abundance ranged from 3.72 to 9.51×10¹ GE.mL⁻¹ (Fig. 3.a). *V. harveyi* was first detected in April when the temperature reached 18.0 °C. The maximal abundances were recorded in mid-May (9.51×10¹ GE.mL⁻¹), mid-July (7.88×10¹ GE.mL⁻¹), and mid-October (7.65×10¹ GE.mL⁻¹), when the rearing water temperatures reached 19.0, 19.6 and 19.1 °C, respectively. Nevertheless, *V. harveyi* was detected in April when no *Vibrio* bacteria were recorded in the cold- and hot-water inlets. The abundance of attached *V. harveyi* detected

in biofilms ranged from 1.45×10^3 to 3.25×10^3 GE.cm⁻² (Fig. 3.b). Attached *V. harveyi* were enumerated from mid-May (1.64×10^3 GE.cm⁻²) until mid-October (2.43×10^3 GE.cm⁻²), with no detection in early September or in early October.

3.5. Influence of environmental factors on cultivable Vibrionaceae and *V. harveyi* dynamics

Statistical analysis highlighted correlations between water temperature and the abundance of presumptive Vibrionaceae in the cold-water inlet (p-value = 0.0065). A positive correlation was detected between water temperature (p-value = 0.0005) and the abundance of presumptive Vibrionaceae in biofilms.

Moreover, statistical analyses highlighted a positive correlation between water temperature and the abundance of *V. harveyi* in the cold-water inlet (p-value=0.0186) and in water from rearing tanks (p-value = 0.0198). A positive correlation was also detected between water temperature and the abundance of *V. harveyi* in biofilms (p-value < 0.0001).

4. Discussion

The seabass aquaculture sector is being challenged by the emergence of recurring vibriosis outbreaks caused by *V. harveyi* (Vendramin *et al.*, 2016). The prevalence of the pathogen in fish is highly correlated with the abundance of the pathogen in the surrounding environment (Kim *et Lee*, 2017). Although the contamination of fish is not the only factor that can exacerbate the development of the disease, the abundance of *V. harveyi*, in rearing water and biofilm may be an accurate indicator of the risk of vibriosis outbreaks. Thus, deeper understanding of the dynamics and spatial patterns of *V. harveyi* in the aquaculture environment is needed.

In this study, we assessed the temporal and spatial dynamics of Vibrionaceae, and the presumptive pathogen *V. harveyi* in particular, from April to October 2018 on a fish farm located in Northern France. Three rearing tanks were chosen from a facility frequently affected by vibriosis. In particular, vibriosis outbreaks, mostly caused by *V. harveyi*, were recorded in 2017

on this fish farm. Furthermore, a few strains of *V. jasicida*, *V. rotiferianus*, *V. owensii*, *V. tasmaniensis*, and *V. gigantis* were also isolated from the spleens of moribund seabass (Mougin *et al.*, 2020b, Mougin *et al.*, 2020a). In 2018, vibriosis outbreaks caused by *V. anguillarum* were recorded (Supplimentary Table 1). According to the aquaculture facility operators, these latter outbreaks were due to a delay in vaccine delivery and were quickly and successfully managed. Some strains of *V. harveyi* were isolated from few moribund fish (Supplimentary Table 1), but no *V. harveyi* vibriosis outbreak has been recorded on the fish farm, particularly in the three rearing tanks used during our monitoring study.

Among potentially pathogenic bacteria for seabass, *P. damsela*, *V. alginolyticus*, *V. owensii*, *V. rotiferianus*, and *V. harveyi* were isolated during our sampling campaign. The species *P. damsela* is divided into two subspecies with clinical and epidemiological differences, both affecting seabass (Vázquez *et al.*, 2014, Essam *et al.*, 2016). *P. damsela* subsp. *piscicida* (formerly *Pasteurella piscicida*) is known as the causative agent of a severe aquatic disease called pasteurellosis, and *P. damsela* subsp. *damsela* (formerly *Vibrio damsela*) is responsible for photobacteriosis commonly defined as sporadic pathologies (Buchmann *et al.*, 2009). Nonetheless, this latter disease had been recognized as an epizootic agent, transmitted by infected fish, and may cause public health problems (Rivas *et al.*, 2013). In our study, presumably, only subspecies *damsela* was recorded, but the MALDI BioTyper database cannot discriminate between these two subspecies (Pérez-Sancho *et al.*, 2016). Given that no mortalities caused by *P. damsela* have been recorded, no further analysis was pursued. In the *Vibrio* genus, the Harveyi clade, especially *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. owensii*, and *V. rotiferianus* were the most frequently isolated species on the fish farm. Importantly, these species have already been isolated from moribund seabass and are considered as potential pathogens on the farm. Nevertheless, *V. harveyi* remains the main pathogen responsible for recurrent vibriosis outbreaks. Interestingly, even though no vibriosis outbreak was recorded, isolates of *V. harveyi* were detected in the rearing tanks from water and biofilm, throughout practically the whole sampling campaign. The development of vibriosis occurs due to disruptions between host-pathogen-

environment interactions (Snieszko, 1974, Toranzo *et al.*, 2005). Thus, many factors, such as the susceptibility and physiological state of the host, the pathogenicity and virulence of the pathogen, and the influence of environmental stress conditions, must be considered. At this fish farm, the absence of vibriosis outbreaks was attributed to the efficiency of the novel annual autogenous vaccine. However, in practical terms, this type of vaccine sometimes appears less efficient from one year to the next and must be regularly renewed, incurring high costs. Another hypothesis is that the strains of *V. harveyi* present on the farm during 2018 were not highly virulent. Our study focused on the abundance of all *V. harveyi* strains without distinguishing pathogens from non-pathogens. There is thus a possibility that the pathogenic isolates detected and collected in 2018 are scarce.

Environmental factors may also have an impact on the development of the disease. The correlation between the abundance of *V. harveyi* and water temperature indicates that the risk of vibriosis outbreaks may vary throughout the year. In the natural marine environment, previous studies have highlighted that the abundance of *Vibrio* spp. may follow seasonal variation in temperate regions (Martinez-Urtaza *et al.*, 2008, Johnson *et al.*, 2012). Water temperature and salinity are considered as the most effective predictors of temporal and spatial distributions. However, in a semi-closed aquaculture system, even though tanks are supplied with natural marine seawater, water quality is extensively monitored and maintained as constant as possible. Consequently, in our study, the environmental parameters monitored in rearing tanks (i.e. pH, salinity, conductivity, and DO) did not vary widely. Water temperature was generally constant, but the month of June and July showed temperatures above 20 °C. Increased prevalence of *V. harveyi* in oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*) was detected at temperatures above 20 °C (Pujalte *et al.*, 1999). Moreover, a previous study (Pujalte *et al.* (2003) reported increased prevalence of *V. harveyi* in European seabass and gilthead seabream during warm months. Consequently, the warmer months of summer may represent a higher risk for vibriosis outbreaks. Furthermore, temperature may not only influence the prevalence of the pathogen, but also the virulence and the physiological state of the host, disturbing the host-pathogen relationship (Paillard *et al.*, 2004, Travers *et al.*, 2009). In the years ahead, the risk of vibriosis

may increase with the rise of water temperature, due to global warming (Travers *et al.*, 2009, Vezzulli *et al.*, 2015).

In the rearing tanks, the abundance of presumptive cultivable Vibrionaceae appeared to follow a seasonal pattern, with the highest values in August and the lowest in April. On the contrary, there was no clear seasonal pattern in the variation of *V. harveyi* abundance. This difference can be attributed to the divergence between monitoring methods. The real-time PCR method is based on a DNA target and provides an estimation of the quantity of cultivable bacteria, viable but not cultivable (VBNC) bacteria, and residual DNA released by dead bacteria. Quantification by plate count on selective media provides an estimation of the quantity of cultivable bacteria only, and does not allow recovery of VBNC bacteria. However, the quantification of VBNC bacteria in the rearing tanks is of significant importance. In particular, VBNC *V. harveyi* may conserve their pathogenic potential and infect a host when they break dormancy under favorable environmental conditions (Sun *et al.*, 2008). Moreover, VBNC bacteria are more resistant to antibiotics than cultivable bacteria (Ayrapetyan *et al.*, 2015). The major drawback of monitoring *V. harveyi* abundance using real-time PCR is the quantification of residual DNA of dead bacteria. A suitable solution, which could be used in a future study, is the use of propidium monoazide (PMA) real-time PCR (Nocker *et al.*, 2006, Mougin *et al.*, 2019). This method allows the estimation of both cultivable and VBNC bacteria, which may represent potential fish pathogens and zoonotic sources.

Overall, the trend in the abundance of *V. harveyi* in the water of rearing tanks may follow the trend recorded in the water inlets. The water inlets may thus represent a source of contamination for the rearing tanks. Moreover, our work highlighted the presence of Vibrionaceae and *V. harveyi* in biofilms on the concrete walls of the rearing tanks. In particular, biofilms may be a reservoir of potentially pathogenic bacteria in aquaculture facilities (Bourne *et al.*, 2006). Their relative resistance to antibiotics and sanitizers make them more threatening to the aquaculture sector (Karunasagar *et al.*, 1996). In our study, attached cultivable Vibrionaceae were detected from day 42 of the sampling campaign and attached *V. harveyi* was detected from day 56. This delay

in detection can be attributed to high water flow and fish movements in the rearing tanks. A better understanding of biofilm dynamics may help develop non-toxic anti-biofilm compounds or preventive anti-biofilm control measures. Quorum-sensing interfering agents hold promise for developing anti-biofilm therapies (Defoirdt, 2017, Arunkumar *et al.*, 2020). Previous studies have reported that the *Piper betle* ethyl acetate extract (PBE) or citrus limonoids may have anti-biofilm properties against *V. harveyi* (Vikram *et al.*, 2011, Srinivasan *et al.*, 2017). Their quorum-sensing interfering properties can be tested on the pathogenic isolates identified and collected from biofilms in this study. This approach may be the key to designing new control measures that can then be integrated in a preventive holistic strategy including hosts, pathogens, and the environment to control vibriosis.

5. Conclusion

In conclusion, the abundance of cultivable Vibrionaceae increased in the rearing tanks during the warm summer months. These bacteria may come from the water inlets, but biofilms may also be a reservoir for potential pathogenic bacteria for seabass. Importantly, several pathogenic bacterial species were isolated from rearing water and biofilm samples: *P. damsela*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. owensii* and *V. rotiferianus*. Overall, *V. harveyi* is considered as the main pathogen on the fish farm and its constant presence represents a risk for vibriosis outbreaks. The correlation between its abundance and water temperature suggests that this risk may increase with the rise of water temperature, caused by global warming. Moreover, the probability of vibriosis outbreaks may be increased by the presence of *V. harveyi* in biofilms, which may facilitate resistance against antibiotics, water sanitizers, and environmental fluctuations.

Future studies must now assess the pathogenicity of virulence of the isolates collected in this study. The pathogenic strains isolated from biofilms can be then used to study biofilm dynamics and to design and develop anti-biofilm control measures. Because *V. harveyi* affects not only seabass, but also a wide range of crustaceans, mollusks, and fishes, these measures can be then adapted to other aquaculture facilities.

Acknowledgements

Julia Mougin would like to thank the Hauts-de-France Regional Council for its financial support of her PhD studies. This work was funded by the French government and the Hauts-de-France Regional Council as part of the CPER 2014-2020 MARCO project. The authors also thank Aquanord-Ictus for contributing to the LUVIBAR project, especially Guillaume Tielie, Anabelle Duhamel and Céline Doyen. The authors are also grateful to the REALCAT platform funded by the French National Research Agency (ANR) as part of the ‘Investments for the Future’ expenditure scheme (ANR-11-EQPX-0037), as well as to Egon Heuson for helpful assistance.

References

- Antajan, E., Devreker, D., Loots, C., Rocroy, M., Alizier, S., and Ruellet, T. (2019). Surveillance écologique du site de production électronucléaire de Gravelines Novembre 2017–Octobre 2018. Ifremer R.ODE/LITTORAL/LER/BL19.02, mars 2019, 208 p.
- Arunkumar, M., LewisOscar, F., Thajuddin, N., Pugazhendhi, A., and Nithya, C. (2020). *In vitro* and *in vivo* biofilm forming *Vibrio* sp: A significant threat in aquaculture. *Process Biochem.* 94, 213-223. doi: 10.1016/j.procbio.2020.04.029.
- Austin, B. (2010). Vibrios as causal agents of zoonoses. *Vet. Microbiol.* 140(3), 310-317. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.015.
- Austin, B., and Zhang, X.H. (2006). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett. Appl. Microbiol.* 43(2), 119-124. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01989.x.
- Ayrapetyan, M., Williams, T.C., and Oliver, J.D. (2015). Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria. *Trends Microbiol.* 23(1), 7-13. doi: 10.1016/j.tim.2014.09.004.
- Bostock, J., Lane, A., Hough, C., and Yamamoto, K. (2016). An assessment of the economic contribution of EU aquaculture production and the influence of policies for its sustainable development. *Aquacult. Int.* 24(3), 699-733. doi: 10.1007/s10499-016-9992-1.
- Bourne, D.G., Høj, L., Webster, N.S., Swan, J., and Hall, M.R. (2006). Biofilm development within a larval rearing tank of the tropical rock lobster, *Panulirus ornatus*. *Aquaculture* 260(1-4), 27-38. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.06.023.
- Buchmann, K., Bresciani, J., Pedersen, K., Ariel, E., Dalsgaard, I., and Madsen, L. (2009). Fish diseases—an introduction. Biofolia. I.S.B.N.: 8791319439
- Dadar, M., Dhama, K., Vakharia, V.N., Hoseinifar, S.H., Karthik, K., Tiwari, R., et al. (2017). Advances in aquaculture vaccines against fish pathogens: global status and current trends. *Rev. Fish. Sci. Aqualc.* 25(3), 184-217. doi: 10.1080/23308249.2016.1261277.
- Defoirdt, T. (2017). Quorum-Sensing systems as targets for antivirulence therapy. *Trends Microbiol.*, 1-16. doi: 10.1016/j.tim.2017.10.005.
- Essam, H., Abdellrazeq, G., Tayel, S., Torkey, H., and Fadel, A. (2016). Pathogenesis of *Photobacterium damsela* subspecies infections in sea bass and sea bream. *Microb. Pathog.* 99, 41-50. doi: 10.1016/j.micpath.2016.08.003.
- FAO (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Ghittino, C., Latini, M., Agnetti, F., Panziera, C., Lauro, L., Ciappelloni, R., et al. (2003). Emerging pathologies in aquaculture: effects on production and food safety. *Vet. Res. Commun.* 27(1), 471-479.
- Johnson, C.N., Bowers, J.C., Griffith, K.J., Molina, V., Clostio, R.W., Pei, S., et al. (2012). Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in the coastal and estuarine waters of Louisiana, Maryland, Mississippi, and Washington (United States). *Appl. Environ. Microbiol.* 78(20), 7249-7257. doi: 10.1128/AEM.01296-12.

- Kahla-Nakbi, A.B., Chaieb, K., Besbes, A., Zmantar, T., and Bakhrouf, A. (2006). Virulence and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from Tunisian cultured gilthead sea bream and sea bass outbreaks. *Vet. Microbiol.* 117(2-4), 321-327. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.06.012.
- Karunasagar, I., Otta, S., and Karunasagar, I. (1996). Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces. *Aquaculture* 140(3), 241-245. doi: 10.1016/0044-8486(95)01180-3.
- Khouadja, S., Lamari, F., and Bakhrouf, A. (2013). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during disease outbreaks. *Int. Aquat. Res.* 5(1), 13.
- Kim, J.Y., and Lee, J.-L. (2017). Correlation of Total Bacterial and *Vibrio* spp. Populations between Fish and Water in the Aquaculture System. *Front. Mar. Sci.* 4, 147. doi: 10.3389/fmars.2017.00147.
- Korun, J., and Timur, G. (2008). Marine vibrios associated with diseased sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *J. FisheriesSciences.com* 2(1), 66-76. doi: 10.3153/jfsc.com.2008007.
- Le-Breton, A. (1999). Mediterranean finfish pathologies: present status and new developments in prophylactic methods. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 19(6), 250-253.
- Martinez-Urtaza, J., Lozano-Leon, A., Varela-Pet, J., Trinanes, J., Pazos, Y., and Garcia-Martin, O. (2008). Environmental determinants of the occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the rias of Galicia, Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(1), 265-274. doi: 10.1128/AEM.01307-07.
- Maulvault, A.L., Barbosa, V., Alves, R., Anacleto, P., Camacho, C., Cunha, S., et al. (2018). Integrated multi-biomarker responses of juvenile seabass to diclofenac, warming and acidification co-exposure. *Aquat. Toxicol.* 202, 65-79. doi: 10.1016/j.aquatox.2018.06.016.
- Montánchez, I., and Kaberdin, V.R. (2019). *Vibrio harveyi*: A brief survey of general characteristics and recent epidemiological traits associated with climate change. *Mar. Environ. Res.*, 104850. doi: 10.1016/j.marenvres.2019.104850.
- Mougin, J., Copin, S., Bojolly, D., Ragueneau, V., Robert-Pillot, A., Quilici, M.-L., et al. (2019). Adhesion to stainless steel surfaces and detection of viable but non cultivable cells of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* isolated from shrimps in seafood processing environments: *Stayin'alive? Food Control* 102, 122-130. doi: 10.1016/j.foodcont.2019.03.024.
- Mougin, J., Flahaut, C., Roquigny, R., Bonnin-Jusserand, M., Grard, T., and Le Bris, C. (2020a). Rapid identification of *Vibrio* species of the the Harveyi clade using MALDI-TOF MS profiling with main spectral profile database implemented with an in-house database: Luvibase. *Front. Microbiol.* 11, 2494.
- Mougin, J., Roquigny, R., Travers, M.-A., Grard, T., Bonnin-Jusserand, M., and Le Bris, C. (2020b). Development of a *mreB*-targeted real-time PCR method for the quantitative detection of *Vibrio harveyi* in seawater and biofilm from aquaculture systems. *Aquaculture*, 735337. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735337.
- Muniesa, A., Basurco, B., Aguilera, C., Furones, D., Reverté, C., Sanjuan-Vilaplana, A., et al. (2020). Mapping the knowledge of the main diseases affecting sea bass and sea bream in Mediterranean. *Transboundary Emerging Dis.* doi: 10.1111/tbed.13482.
- Nocker, A., Cheung, C.-Y., and Camper, A.K. (2006). Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J. Microbiol. Methods* 67(2), 310-320. doi: 10.1016/j.mimet.2006.04.015.
- O'Toole, R., Von Hofsten, J., Rosqvist, R., Olsson, P.-E., and Wolf-Watz, H. (2004). Visualisation of zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum*. *Microb. Pathog.* 37(1), 41-46. doi: 10.1016/j.micpath.2004.03.001.
- Paillard, C., Allam, B., and Oubella, R. (2004). Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Org.* 59(3), 249-262. doi: 10.3354/dao059249.
- Pérez-Sancho, M., Ana, I.V., Awad, M., Kostrzewa, M., Domínguez, L., and Fernández-Garayzábal, J.F. (2016). Differentiation of *Photobacterium damsela* subspecies using matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in fish isolates. *Aquaculture* 464, 159-164. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.06.024.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., and Team, R.C. (2018). nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-137. *Vienna, Austria: R Foundation*.
- Prayitno, S.B., and Latchford, J. (1995). Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of

- salinity and pH on infectiosity. *Aquaculture* 132(1-2), 105-112. doi: 10.1016/0044-8486(94)00374-W.
- Pujalte, M., Sitjà-Bobadilla, A., Macián, M., Belloch, C., Alvarez-Pellitero, P., Pérez-Sánchez, J., et al. (2003). Virulence and molecular typing of *Vibrio harveyi* strains isolated from cultured dentex, gilthead sea bream and European sea bass. *Syst. Appl. Microbiol.* 26(2), 284-292. doi: 10.1078/072320203322346146.
- Pujalte, M.J., Ortigosa, M., Macián, M.C., and Garay, E. (1999). Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater. *Int. Microbiol.* 2(4), 259-266.
- R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing.
- Rivas, A.J., Lemos, M.L., and Osorio, C.R. (2013). *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a bacterium pathogenic for marine animals and humans. *Front. Microbiol.* 4, 283. doi: 10.3389/fmicb.2013.00283.
- Snieszko, S. (1974). The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J. Fish Biol.* 6(2), 197-208. doi: 10.1111/j.1095-8649.1974.tb04537.x.
- Srinivasan, R., Santhakumari, S., and Ravi, A.V. (2017). *In-vitro* antibiofilm efficacy of *Piper betle* against quorum sensing mediated biofilm formation of luminescent *Vibrio harveyi*. *Microb. Pathog.* 110, 232-239. doi: 10.1016/j.micpath.2017.07.001.
- Sun, F., Chen, J., Zhong, L., Zhang, X.-h., Wang, R., Guo, Q., et al. (2008). Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64(1), 37-44.
- Toranzo, A.E., Magariños, B., and Romalde, J.L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246(1-4), 37-61. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.01.002.
- Travers, M.A., Basuyaux, O., Le Goïc, N., Huchette, S., Nicolas, J.L., Koken, M., et al. (2009). Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Glob. Chang. Biol.* 15(6), 1365-1376. doi: 10.1111/j.1365-2486.2008.01764.x.
- Vázquez, F.J.S., and Muñoz-Cueto, J.A. (2014). Biology of European sea bass. CRC Press.
- Vazzana, M., Cammarata, M., Cooper, E., and Parrinello, N. (2002). Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. *Aquaculture* 210(1-4), 231-243. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00818-3.
- Vendramin, N., Zrncic, S., Padrós, F., Oraic, D., Le Breton, A., Zarza, C., et al. (2016). Fish health in Mediterranean Aquaculture, past mistakes and future challenges. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 36(1), 38-45.
- Vezzulli, L., Pezzati, E., Brettar, I., Höfle, M., and Pruzzo, C. (2015). Effects of Global Warming on *Vibrio* Ecology. *Microbiol. Spectrum.* doi: 10.1128/microbiolspec.VE-0004-2014.
- Vikram, A., Jesudhasan, P.R., Jayaprakasha, G., Pillai, S.D., and Patil, B.S. (2011). Citrus limonoids interfere with *Vibrio harveyi* cell-cell signalling and biofilm formation by modulating the response regulator LuxO. *Microbiology* 157(1), 99-110. doi: 10.1099/mic.0.041228-0.
- Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant graphics for data analysis. Springer-Verlag, New York, USA, pp. 260.

Supplemental data

Supplementary Figure 1. Photographs of the fragments of concrete collected on the fish farm from April to October 2018.



Supplementary Table 1. Identification of pathogenic bacteria isolated from the spleens of moribund seabass (*Dicentrarchus labrax*) on the fish farm in 2018. Two methods were used to identify the isolates: the *mreB*-targeted real-time PCR specific to *Vibrio harveyi* the MALDI-TOF MS technique using the Bruker BioTyper ver. 9.0.0.0 database supplemented with the Luvibase database.

Tested strains/Isolates	<i>mreB</i> -targeted real time PCR, specific to <i>V. harveyi</i>	MALDI-TOF MS		Assigned species
		Bruker + Luvibase databases Identification	log-score	
10187	+	<i>V. harveyi</i>	● 2.48	<i>V. harveyi</i>
10188	+	<i>V. harveyi</i>	● 2.46	<i>V. harveyi</i>
10189	+	<i>V. harveyi</i>	● 2.65	<i>V. harveyi</i>
10195	+	<i>V. harveyi</i>	● 2.64	<i>V. harveyi</i>
10196	+	<i>V. harveyi</i>	● 2.45	<i>V. harveyi</i>
11306	+	<i>V. harveyi</i>	● 2.54	<i>V. harveyi</i>
11307	+	<i>V. harveyi</i>	● 2.43	<i>V. harveyi</i>
3189.4	+	<i>V. harveyi</i>	● 2.45	<i>V. harveyi</i>
3193.5	+	<i>V. harveyi</i>	● 2.50	<i>V. harveyi</i>
3196.3	+	<i>V. harveyi</i>	● 2.50	<i>V. harveyi</i>
8708	+	<i>V. harveyi</i>	● 2.44	<i>V. harveyi</i>
9846	+	<i>V. harveyi</i>	● 2.57	<i>V. harveyi</i>
5422	-	<i>V. anguillarum</i>	● 2.50	<i>V. anguillarum</i>
6515	-	<i>V. anguillarum</i>	● 2.49	<i>V. anguillarum</i>
6576	-	<i>V. anguillarum</i>	● 2.48	<i>V. anguillarum</i>
6578	-	<i>V. anguillarum</i>	● 2.48	<i>V. anguillarum</i>
6632	-	<i>V. anguillarum</i>	● 2.48	<i>V. anguillarum</i>
6658	-	<i>V. anguillarum</i>	● 2.41	<i>V. anguillarum</i>
6575	-	<i>V. anguillarum</i>	● 2.45	<i>V. anguillarum</i>
6656	-	<i>V. anguillarum</i>	● 2.51	<i>V. anguillarum</i>
6882	-	<i>V. anguillarum</i>	● 2.46	<i>V. anguillarum</i>
7077	-	<i>V. anguillarum</i>	● 2.42	<i>V. anguillarum</i>

3. Etude préliminaire des capacités d'adhésion et de formation de biofilms

D'après les données collectées lors de la campagne d'échantillonnage, des souches potentiellement pathogènes pour le bar commun, notamment *V. harveyi*, sont capables de former des biofilms sur la paroi des bassins en béton. Ces biofilms peuvent induire une persistance des souches dans les bassins, entraînant un risque de récurrence des épisodes de vibriose au sein de la ferme. Afin de prévenir et de trouver des moyens de lutte contre l'établissement de ces biofilms, il est primordial d'apporter des éléments de compréhension concernant leur dynamique d'adhésion et de formation. Ainsi, lors de ces travaux de thèse, des essais préliminaires ont été réalisés afin de mettre au point un protocole d'étude de la capacité à former des biofilms, dans l'objectif d'étudier les isolats collectés lors de la campagne d'échantillonnage.

3.1. Tentative d'étude *in vitro* de formation de biofilms sur béton

Dans un premier temps, nous voulions établir un protocole d'étude haut-débit permettant de traiter un grand nombre d'isolats, dans des conditions similaires à celles rencontrées dans les bassins d'Aquanord-Ichtus. Etant donné que la dynamique de formation de biofilms est étroitement liée aux propriétés de la surface d'adhésion, un protocole de tests *in vitro* de formation de biofilms sur les morceaux de béton, avait été envisagé. L'idée était d'utiliser et d'adapter le protocole mis au point au cours de mon stage de fin d'étude d'ingénieur et publié au cours de cette thèse (Mougin *et al.*, 2019) (Annexe 1, Article 4, p.254). Brièvement, la cinétique de formation de biofilms de *Vibrio cholerae* et *Vibrio parahaemolyticus* sur acier inoxydable a été étudiée avec des points réguliers à 3 h, 24 h et 48 h. Les bactéries viables, VNC et mortes ont été quantifiées par qPCR, les bactéries viables et VNC ont été quantifiées par PMA-qPCR, et enfin les bactéries cultivables ont été quantifiées par méthodes culturales. Pour finir, l'analyse de la structure du biofilm a été réalisée par microscopie à épifluorescence (Imager.Z1, Zeiss) à l'aide du colorant LIVE/DEAD® BacLight™, permettant de distinguer les

bactéries mortes des bactéries viables et VNC. Ce protocole permettait de fournir des informations sur la viabilité des bactéries au cours du développement des biofilms.

Toutefois, lors de l'adaptation de ce protocole pour cette étude, deux problèmes de taille se sont présentés : la stérilisation préalable des morceaux de béton et l'observation au microscope. En effet, la stérilisation du béton par autoclave n'était pas une solution envisageable puisqu'un composant du béton, l'ettringite, se décompose à des températures supérieures à 100 °C, changeant la structure de celui-ci (Zhou et Glasser, 2001, Lv *et al.*, 2015). Des tentatives de stérilisation avaient été réalisées comme décrit dans la publication de Lv *et al.* (2015). Brièvement, des bains d'éthanol (75 % ou 95 %) successifs ont été effectués (24 h, 48 h, ou 72 h) puis les morceaux de béton ont été placés à 60 °C afin d'éliminer les résidus d'éthanol. Malheureusement, aucune de ces tentatives n'a permis de stériliser ces derniers de manière répétable. De plus, la surface des morceaux de béton étant poreuse et pas totalement plane, il était très difficile d'obtenir une observation nette par microscopie. Nous nous étions alors tournés vers la Microscopie Electronique à Balayage (MEB), mais le temps de préparation des échantillons était finalement un frein à nos essais, d'autant plus que le nombre d'isolats à étudier était très important (1009 isolats).

Par la suite, nous nous sommes donc orientés vers un protocole d'étude, dans des conditions différentes de celles *in vivo*, mais largement détaillé et utilisé dans la littérature : l'étude de la capacité à former des biofilms en microplaques avec marquage au cristal violet.

3.2. Quantification relative de la formation de biofilm par coloration au cristal violet

La quantification relative de la formation de biofilm par coloration au cristal violet, dérivée du protocole de Christensen *et al.* (1985), est considérée comme la méthode de référence pour la caractérisation de la capacité des bactéries à former des biofilms. Le principe de cette méthode repose sur la coloration des bactéries adhérentes par cristal violet (colorant capable de pénétrer la membrane des bactéries et de colorer l'ADN), suivie de la quantification relative de la biomasse

adhérente par mesure d'absorbance du cristal violet. Le protocole développé ici a été mis au point à partir des protocoles de O'Toole (2011), Han *et al.* (2016) et Song *et al.* (2017).

Des cultures bactériennes ont été préparées dans un milieu liquide LBS (Luria-Bertani supplémenté avec 20 % NaCl) pendant 24 h à 37 °C. Un lavage a été réalisé par centrifugation ($5000 \times g$, 10 min) et le culot a été repris dans du LBS stérile, afin d'apporter de nouveaux nutriments. Une suspension bactérienne a été préparée, par ajustement de la DO_{490} à 0,5. Un volume de 200 μL de cette suspension a été déposé dans des puits d'une microplaque 96 puits en polystyrène (Falcon®, transparente, fond plat, non traitée pour la culture cellulaire, stérile). Un volume de 200 μL de milieu de culture liquide LBS stérile a également été déposé en tant que contrôle négatif. La microplaque a été incubée 24 h à 37 °C. La suspension bactérienne a été retirée et trois lavages successifs ont été réalisés avec 200 μL d'eau physiologique stérile, afin d'éliminer les bactéries non adhérentes. Après séchage sous hotte aspirante (10 min), un volume de 200 μL de cristal violet à 0,1 % (Conda S.A., Madrid, Espagne) a été ajouté dans chaque puits et la plaque a été incubée 30 min, à température ambiante. Le cristal violet a ensuite été retiré et les puits ont d'abord été lavés par bain d'eau physiologique, puis par ajout de 200 μL d'eau physiologique, afin de retirer l'excédent de cristal violet. Après séchage (45 min), un volume de 200 μL d'éthanol 95 % a été ajouté dans chaque puits afin de solubiliser le cristal violet. Lorsque la solubilisation était totale, la DO_{590} a été mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre Xenius XC (SAFAS, Monte Carlo, Monaco). La différence entre la DO_{590} des puits contenant la suspension bactérienne et la $DO_{590 \text{ Contrôle}}$ du contrôle négatif contenant du LBS seul, a été utilisée afin de caractériser la capacité des souches à former des biofilms. Les critères ont été établis tel que décrit par Song *et al.* (2017) : pas de formation de biofilms ($DO_{590} < DO_{590 \text{ Contrôle}}$), faible capacité à former des biofilms ($DO_{590 \text{ Contrôle}} < DO_{590} < 2 \times DO_{590 \text{ Contrôle}}$), capacité modérée ($2 \times DO_{590 \text{ Contrôle}} < DO_{590} < 4 \times DO_{590 \text{ Contrôle}}$), forte capacité ($DO_{590} > 4 \times DO_{590 \text{ Contrôle}}$).

La capacité à former des biofilms a été étudiée pour (i) une souche de *V. harveyi* de collection, (ii) 12 isolats de *V. harveyi* collectés à partir de la rate de poissons moribonds en 2017 (détail des caractéristiques dans le **Chapitre I**) dont 2 souches utilisées pour mettre au point l'auto-

capables de former des biofilms. Il est ainsi plausible que les souches pathogènes de poissons persistent dans les bassins d'Aquanord-Ichtus sous forme de biofilms.

Ce protocole est une première approche pour différencier les souches formatrices de biofilm des souches non ou faiblement formatrices. Néanmoins, celui-ci est chronophage et n'est aujourd'hui pas adapté à une étude haut-débit. Il ne pourra donc pas être utilisé afin d'étudier la formation de biofilm de l'ensemble des isolats collectés sur Aquanord-Ichtus. De plus, les critères permettant de caractériser la capacité à former des biofilms (faible, modérée et forte) ne sont pas standardisés et divergent d'une étude à l'autre. Afin de pallier ces différents inconvénients, nous nous sommes donc tournés vers un autre dispositif, le Biofilm Ring Test[®], selon un protocole moins chronophage, moins toxique pour l'expérimentateur, standardisé et reproductible (Chavant *et al.*, 2007).

3.3. Caractérisation du biofilm grâce au Biofilm Ring Test[®]

Un partenariat a été mis en place avec l'entreprise BioFilm Control, commercialisant des kits de Biofilm Ring Test[®], dans le cadre du projet FEAMP LUVIBAR. Les résultats présentés ici sont issus des données obtenues par l'entreprise.

Le principe du Biofilm Ring Test[®] (BRT) repose sur la capacité des bactéries à immobiliser des microbilles, sous l'influence d'un champ magnétique. Une suspension bactérienne est préparée avec des microbilles magnétisables et déposée dans les puits d'une microplaque. Celle-ci est incubée puis des mesures d'adhésion sont directement effectuées sans étape de lavage ou de marquage. Pour cela, la microplaque est déposée sur un support aimanté, générant un champ magnétique. Sous l'influence de ce champ, les microbilles libres vont s'agglomérer au centre du puits, entraînant l'apparition d'un spot brun, visible macroscopiquement. À l'inverse, les microbilles immobilisées dans un biofilm ne pourront pas se déplacer, et aucun spot n'apparaîtra. L'analyse d'images par le logiciel BFC Elements[®] permet ensuite de caractériser l'adhésion des bactéries grâce à un indice de formation de biofilm (BFI). Le principe de ce test est schématisé par la Figure 30.

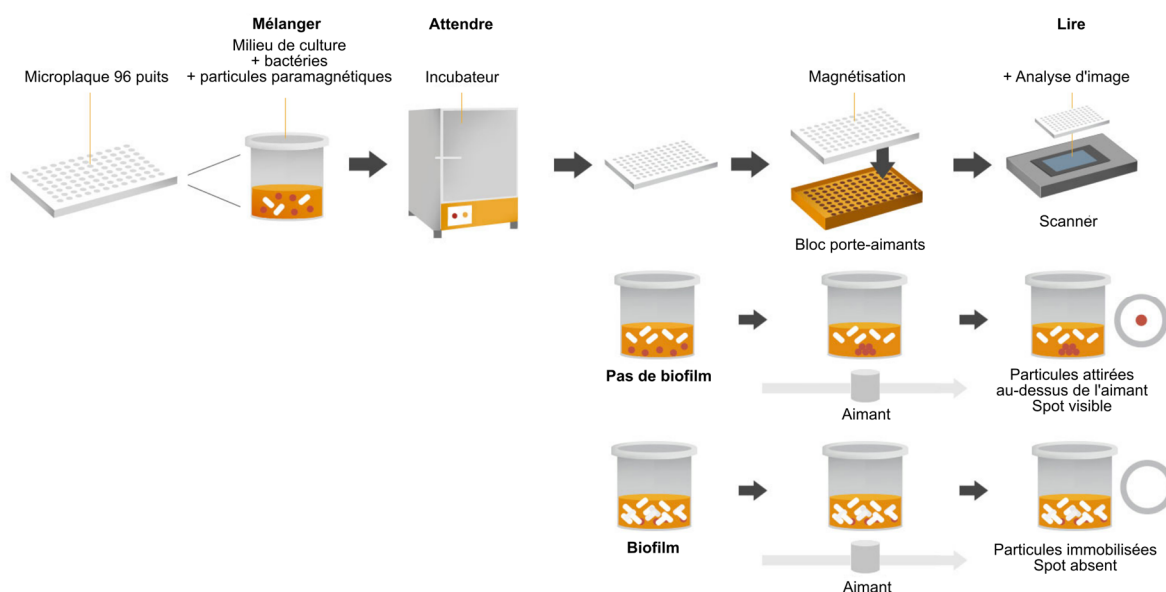


Figure 30 : Schéma du principe du Biofilm Ring Test[®] commercialisé par l'entreprise BioFilm Control[®].

Lors de ces travaux, le BRT (BioFilm Control, Saint Beauzire, France) a été utilisé pour étudier la cinétique de formation du biofilm à différents temps : 4 h, 8 h, 24 h, 32 h, 48 h, 72 h, ainsi que la force d'adhésion de celui-ci à 24 h, selon deux protocoles différents.

Cinétique de formation du biofilm

Des cultures bactériennes ont été préparées dans un milieu liquide LBS (Luria-Bertani supplémenté avec 20 % NaCl) pendant 24 h à 20 °C. Cette culture a été ajustée à une DO_{600} de 1/250 (10^6 UFC.mL⁻¹). La solution TON0004, contenant des microbilles, a été ajoutée à cette suspension afin d'obtenir une concentration finale de 1 % (v/v). Un volume de 200 µL de cette solution a été déposé dans des puits d'une microplaque 96 puits. Un volume de 200 µL de milieu de culture liquide LBS stérile a également été déposé en tant que contrôle négatif. La microplaque a été incubée à 20 °C pendant 4 h, 8 h, 24 h, 32 h, 48 h ou 72 h. Après incubation, la microplaque a été préparée pour l'étape de lecture. Les puits ont été recouverts de 120 µL de liquide de contraste. La plaque a ensuite été déposée sur le support aimanté pendant 1 min. Le BFI a alors été déterminé grâce au logiciel d'analyse d'images BFC Elements[®].

Caractérisation de la force d'adhésion du biofilm à 24 h Ce protocole a été mis au point à partir du protocole de [Di Domenico *et al.* \(2016\)](#), dénommé le clinical Biofilm Ring Test. Des cultures bactériennes ont été préparées dans un milieu liquide LBS (Luria-Bertani supplémenté avec 20 % NaCl) pendant 24 h à 20 °C. Cette culture a été ajustée à une DO_{600} de 0,19 (10^8 UFC.mL⁻¹). Un volume de 220 µL de cette suspension a été ajoutée à la première ligne de la microplaque, puis des dilutions en séries au dixième (de 10^{-1} à 10^{-6} , c'est-à-dire de 10^7 à 10^2 UFC.mL⁻¹) ont été réalisées dans du LBS stérile contenant une concentration de 10 µL.mL⁻¹ de la solution TON0004, incluant les microbilles, pour un volume final de 200 µL par puits. Après 24 h d'incubation à 20 °C, l'étape de lecture est réalisée telle que décrite précédemment. Les valeurs de BFI obtenues ont ensuite été utilisées pour déterminer le seuil *cut-off* (BFIc) et le Potentiel de formation du Biofilm (BP) tels que décrits par [Di Domenico *et al.* \(2016\)](#). Ces valeurs ont alors permis de caractériser la force d'adhésion du biofilm telle que : non productrice de biofilm (BP < 2 BFIc à 10^{-1}), faible (BP > 2 BFIc à 10^{-1} et/ou 10^{-2}), modérée (BP > 2 BFIc à 10^{-3} et/ou 10^{-4}) et forte (BP > 2 BFIc à 10^{-5} et/ou 10^{-6}).

Grâce à ces 2 protocoles, la cinétique de formation du biofilm et la force d'adhésion à 24 h ont été déterminées pour (i) 3 isolats de *V. harveyi* collectés à partir de rates de poissons moribonds en 2017 (détail des caractéristiques dans le **Chapitre II, Article 1**) et utilisés pour mettre au point l'auto-vaccin sur Aquanord-Ichtus en 2018, (ii) 12 isolats de *V. harveyi* collectés en 2018 à partir de rates de poissons moribonds (détail des caractéristiques dans le *supplemental data* de l'**Article 3**) dont un isolat (10189) a été utilisé pour mettre au point l'auto-vaccin sur Aquanord-Ichtus en 2019 et (iii) 12 isolats de *V. harveyi* collectés à partir des échantillons de biofilms formés sur les morceaux de béton, lors de la campagne d'échantillonnage précédemment décrite. Ces isolats ont été choisis en fonction de la période d'échantillonnage et de leurs caractéristiques phénotypiques différentes. Ces données sont détaillées dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Détail des caractéristiques morphologiques d'isolats collectés à partir de biofilms lors de la campagne d'échantillonnage, menée d'avril à octobre 2018.

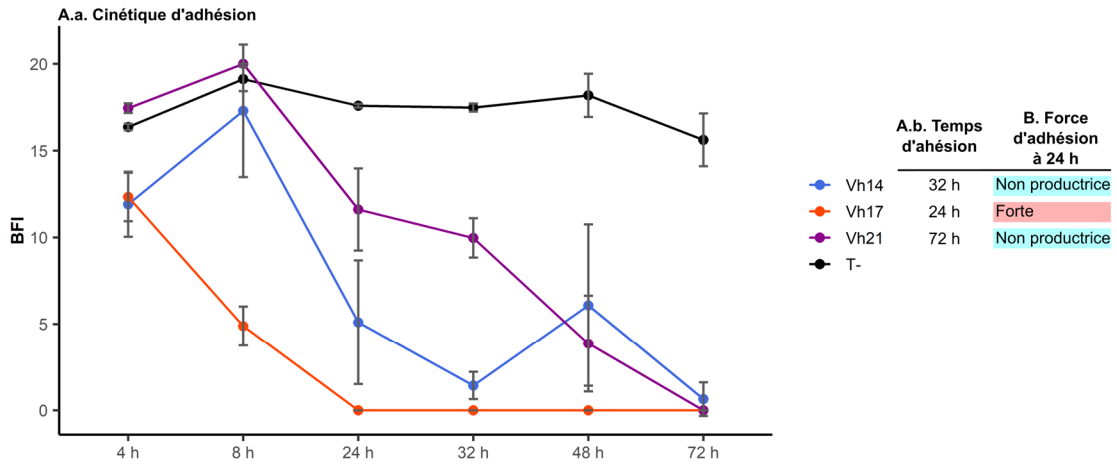
Isolat	Date de collecte	Origine	Echantillon	Identification par MALDI-TOF MS		Morphologie des colonies sur TCBS				
				Base de données Bruker + Luvibase	Identification log-score	Taille *	Couleur	Forme	Halo **	
361	16/05/2018	Bassin 1	Biofilm	<i>V. harveyi</i>	● 2,61	M	Jaune clair	Ronde	-	
856	30/05/2018	Bassin 3	Biofilm	<i>V. harveyi</i>	● 2,52	G	Jaune	Ronde	-	
422	13/06/2018	Bassin 3	Biofilm	<i>V. harveyi</i>	● 2,40	M	Vert foncé	Ronde	-	
91	27/06/2018	Bassin 1	Biofilm	<i>V. harveyi</i>	● 2,37	G	Jaune/marron	Diforme	-	
506	11/07/2018	Bassin 3	Biofilm	<i>V. harveyi</i>	● 2,48	M	Vert foncé	Ronde	+	
287	27/07/2018	Bassin 3	Biofilm	<i>V. harveyi</i>	● 2,60	G	Jaune foncé	Ronde	-	
765	08/08/2018	Bassin 2	Biofilm	<i>V. harveyi</i>	● 2,47	G	Vert foncé	Ronde	+	
659	22/08/2018	Bassin 1	Biofilm	<i>V. harveyi</i>	● 2,53	M	Vert clair	Ronde	-	
28	05/09/2018	Bassin 2	Biofilm	<i>V. harveyi</i>	● 2,40	M	Jaune foncé	Ronde	+	
961	19/09/2018	Bassin 2	Biofilm	<i>V. harveyi</i>	● 2,62	G	Jaune	Ronde, bords irisés	-	
171	17/10/2018	Bassin 1	Biofilm	<i>V. harveyi</i>	● 2,52	G	Vert foncé	Ronde	+	
601	31/10/2018	Bassin 2	Biofilm	<i>V. harveyi</i>	● 2,48	G	Jaune	Ronde	+	

* M = taille moyenne, G = grande taille

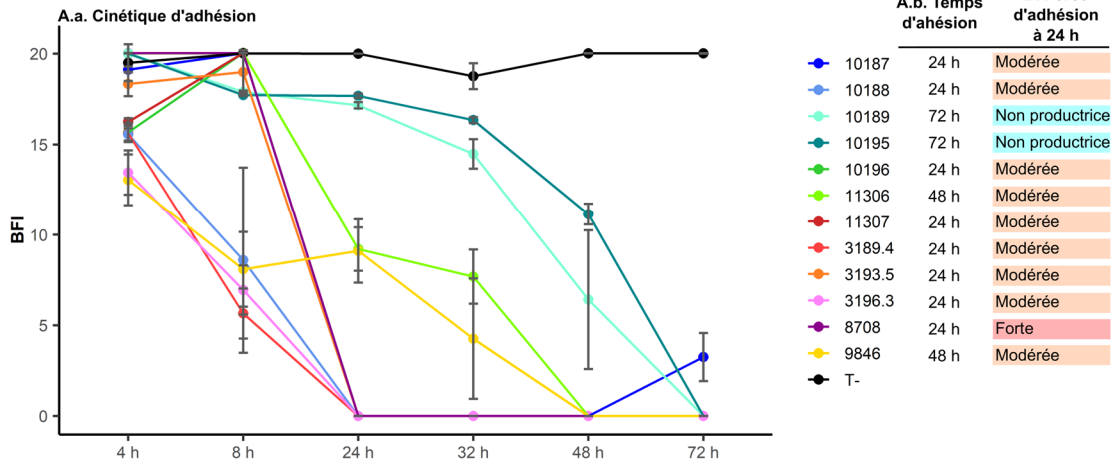
** + = présence d'un halo, - = absence d'un halo

Enfin, les résultats obtenus par BioFilm Control à partir de ces différentes souches sont présentés dans la Figure 31.

1. Isolats de rates de poissons moribonds collectés en 2017, utilisés pour mettre au point le vaccin en 2018



2. Isolats de rates de poissons moribonds collectés en 2018



3. Isolats de biofilms formés sur le béton, collectés en 2018

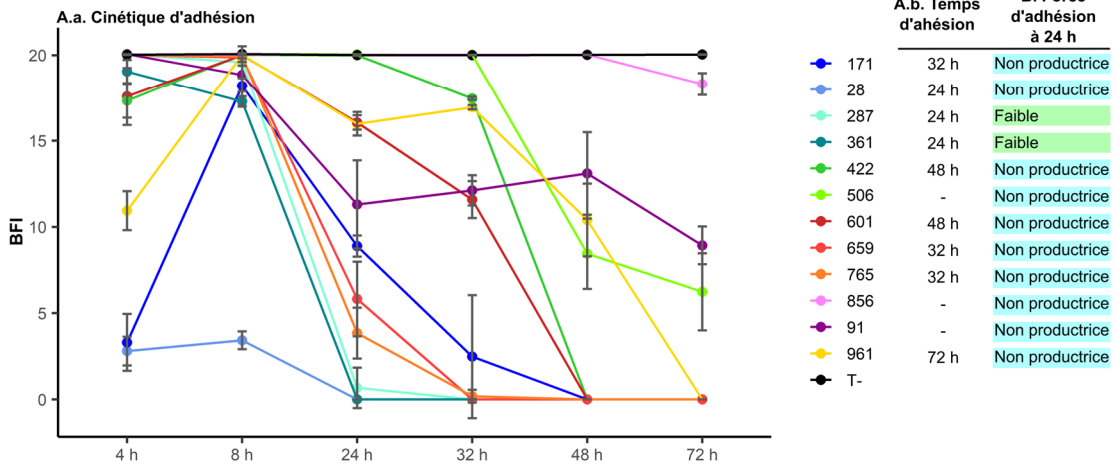


Figure 31 : Résultats obtenus avec le Biofilm Ring Test® par BioFilm Control pour des isolats de *V. harveyi*. A. Résultats de l'étude de la cinétique d'adhésion avec A.a. le détail de la cinétique au cours du temps et A.b. le temps nécessaire aux bactéries pour former un biofilm. Chaque point des courbes représente la moyenne de 24 valeurs (4 puits pour 6 plaques), les barres d'erreurs représentent l'écart type. Une valeur de BFI élevée indique une forte mobilité des microbilles sous l'action de l'aimant, correspondant à l'absence de biofilm. Un BFI proche de 0 indique une immobilisation des microbilles suite à la formation d'un biofilm. B. Résultats de l'étude de la force d'adhésion du biofilm à 24 h. Les tests ont été réalisés en duplicatas.

D'après les résultats de l'étude de la cinétique d'adhésion (Figure 31 A.a. et A.b.), tous les isolats sont capables de former un biofilm en moins de 72 h exceptés 3 isolats collectés à partir des biofilms formés sur béton (isolats 506, 856, 91), (Figure 31 3.A.a et 3.A.b). Au total, 44 % des isolats étaient capables de former un biofilm en 24 h, 15 % en 32 h, 15 % en 48 h et 15 % en 72 h. Ainsi, la majorité des isolats formant des biofilms en 24 h, la force d'adhésion a été déterminée pour 24 h d'adhésion (Figure 31 B.). Les résultats ont montré que 27 % des isolats collectés à partir de rates de poissons moribonds sont non producteurs de biofilm à 24 h, 60% témoignent d'une force d'adhésion modérée à 24 h et 13 % témoignent d'une force d'adhésion forte à 24 h. En revanche, 83 % des isolats collectés à partir des biofilms formés sur béton sont non producteurs de biofilm à 24 h et 17 % témoignent d'une force d'adhésion faible à 24 h. Néanmoins, il faut ici souligner que l'étude de la force d'adhésion a été réalisée à 24 h. Or, d'après la cinétique d'adhésion, ces isolats sont bien capables de former des biofilms pour des temps supérieurs à 24 h.

Ces résultats préliminaires nous ont permis de décrire différentes cinétiques au sein des isolats collectés sur Aquanord-Ichtus. En général, le temps d'adhésion des isolats collectés à partir de biofilms sur béton est plus long que celui des isolats collectés à partir de rates de poissons moribonds. Toutefois, ces études ont été réalisées sur un nombre restreint d'isolats, dans des conditions *in vitro* très différentes des conditions retrouvées dans les bassins d'Aquanord-Ichtus, c'est-à-dire en conditions statiques, dans un milieu de culture riche, avec une monoculture et une surface en polystyrène. Cette étude est donc une première étape qui nous permettra, par la suite, de mettre au point le protocole d'étude de formation de biofilms dans des conditions plus proches de celles retrouvées sur Aquanord-Ichtus.

Schéma de synthèse

Objectif : Evaluer le risque *Vibrio* au sein de la ferme aquacole Aquanord-Ichtus par l'étude de la distribution spatiale et temporelle des Vibrionaceae cultivables à 37 °C et plus particulièrement de *V. harveyi*, ainsi que l'étude de l'impact de différents facteurs environnementaux biotiques et abiotiques.

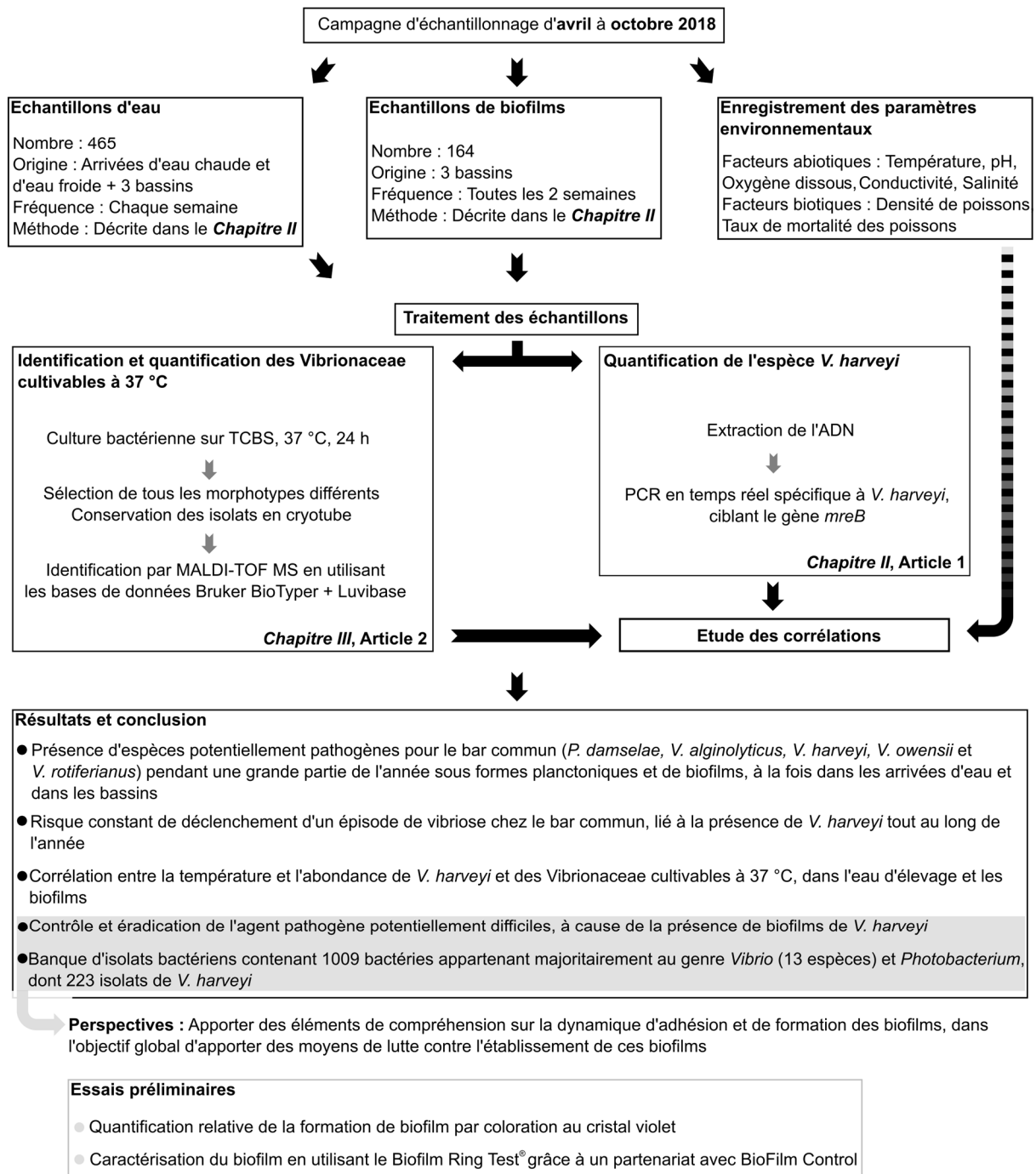


Figure 32 : Schéma de synthèse du Chapitre IV, relatif à l'étude de la distribution spatiale et temporelle des Vibrionaceae et de l'espèce *Vibrio harveyi* dans un élevage de bars communs.

Discussion et perspectives

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans la problématique de la vibriose du bar commun d'élevage (*Dicentrarchus labrax*), thématique très récente au sein de l'unité Biochimie des Produits Aquatiques (BPA) de l'UMR transfrontalière INRAe n°1158 BioEcoAgro et initiée à travers cette thèse. Ces travaux ont été réalisés en partenariat avec la ferme aquacole Aquanord-Ichtus, faisant face à des épisodes de vibriose récurrents, principalement causés par l'espèce *Vibrio harveyi*, impactant fortement l'équilibre économique de l'entreprise.

L'objectif principal de la thèse était d'apporter des éléments de compréhension, à travers la combinaison d'approches microbiologiques et moléculaires, visant à optimiser la gestion du risque *Vibrio* pour le bar commun d'élevage. Cela implique une bonne connaissance de la dynamique spatio-temporelle des bactéries, capables d'engendrer la vibriose chez le bar commun, au sein de la ferme. En effet, leurs comportements ainsi que leurs capacités de persistance et de multiplication déterminent, en partie, leur impact sur l'environnement et plus particulièrement sur les poissons. Ces comportements bactériens sont eux-mêmes influencés par des facteurs environnementaux biotiques et/ou abiotiques.

Afin de répondre à ces objectifs, la stratégie adoptée lors de ces travaux de thèse a reposé dans un premier temps sur la mise au point d'outils et de méthodes de détection et d'identification, dans une perspective de suivi environnemental (**Chapitre II et III, Article 1 et 2**). Ce suivi a été réalisé dans un second temps *via* l'étude de la dynamique spatio-temporelle des Vibrionaceae potentiellement pathogènes pour le bar commun, et plus particulièrement de *V. harveyi*, au sein d'Aquanord-Ichtus (**Chapitre IV, Article 3**).

Ces travaux de recherche, nous ont ainsi conduits :

- à la mise au point et à la validation d'une PCR en temps réel spécifique à l'espèce *V. harveyi*, principal agent responsable de la vibriose sur Aquanord-Ichtus (**Chapitre II, Article 1**)
- à la conception d'une nouvelle base de données, dénommée Luvibase, permettant l'identification des espèces du clade Harveyi par MALDI-TOF MS (**Chapitre III, Article 2**)
- à l'élaboration d'une stratégie d'échantillonnage et d'isolement de souches bactériennes issues de l'eau d'élevage et des biofilms formés sur les parois en béton des bassins d'Aquanord-Ichtus (**Chapitre II et IV, Article 1 et 3**)
- à la caractérisation de la distribution spatio-temporelle des Vibrionaceae cultivables à 37 °C et plus particulièrement de *V. harveyi*, au sein d'Aquanord-Ichtus et à la l'étude des corrélations entre les paramètres environnementaux et l'abondance de ces bactéries (**Chapitre IV, Article 3**)
- à la conception d'une banque d'isolats bactériens d'origine aquacole, comprenant plus d'un millier de bactéries appartenant majoritairement au genre *Vibrio* (13 espèces) et *Photobacterium*, et plus particulièrement 223 isolats de *V. harveyi* (**Chapitre IV, Article 3**)

1. Les outils et méthodes d'identification

La 1^{ère} étape de mes travaux a consisté à mettre au point des outils et méthodes de détection et d'identification spécifiques à l'espèce *V. harveyi* ou plus largement au clade Harveyi. Les méthodes développées au cours de ma thèse ont été adaptées afin de quantifier l'espèce *V. harveyi* directement dans des échantillons d'eau et de biofilms issus d'aquaculture, mais également pour établir un criblage rapide des bactéries isolées de ces échantillons. En ce sens, les méthodes d'identification phénotypiques, ainsi que les méthodes moléculaires, telles que la MLSA (MultiLocus Sequence Analysis), ont rapidement été écartées de par leur caractère chronophage

(Bonnin-Jusserand *et al.*, 2017). Ainsi, notre choix s'est porté sur des techniques de PCR en temps réel et de MALDI-TOF MS.

1.1. Les méthodes moléculaires

Afin de mettre au point la méthode de PCR en temps réel, il a fallu identifier une cible génétique spécifique à l'espèce *V. harveyi*. Les cibles génétiques couramment utilisées chez les bactéries du genre *Vibrio* sont des gènes de ménage, codant pour des fonctions essentielles à la bactérie, tels que le gène codant pour l'ARNr 16S, ou les gènes *ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *pyrH*, *recA*, *rpoA* ou *topA* (Thompson *et al.*, 2005, Thompson *et al.*, 2007, Sawabe *et al.*, 2013). Ces gènes présentent des pouvoirs de résolution divergeants en fonction du groupe d'espèces ciblé. Par exemple, les gènes *rpoA*, *recA*, et *pyrH* ne permettent pas de différencier les espèces *V. coralliilyticus/V. neptunius* et *V. anguillarum/V. ordalii* alors qu'ils permettent de différencier les espèces *V. campbellii/V. harveyi* (Thompson *et al.*, 2005).

L'identification d'une seule cible génétique spécifique est d'autant plus complexe au sein du clade Harveyi que la similarité des génomes y est très forte (Gomez-Gil *et al.*, 2004). Par exemple, le gène codant pour l'ARNr 16S ou le gène *rpoB* possèdent un faible pouvoir de résolution et ne sont pas adaptés à la différenciation de certaines espèces au sein du clade Harveyi (Gomez-Gil *et al.*, 2004, Erler *et al.*, 2015). En effet, comme démontré dans ces travaux, le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S ne permet pas de différencier certaines souches de *V. alginolyticus/V. natriegens/V. parahaemolyticus* (**Chapitre III, Article 2**). De plus, la diversité génétique au sein même d'une espèce et la plasticité génétique liée en partie au transfert horizontal de gènes, rendent l'identification de cibles génétiques encore plus fastidieuse (Conejero et Hedreyda, 2003, Rowe-Magnus *et al.*, 2006).

Au cours de ces travaux de thèse, 3 cibles génétiques ont été envisagées et testées afin d'identifier spécifiquement *V. harveyi* : le gène *toxR*, très régulièrement employé dans la littérature (Pang *et al.*, 2006, Schikorski *et al.*, 2013), et les gènes *topA* et *mreB* dont la concaténation des loci permet de différencier les espèces proches de *V. harveyi* (Cano-Gomez *et al.*, 2011). Les amorces ciblant

les gènes *toxR* et *topA* étaient déjà disponibles dans la littérature (Pang *et al.*, 2006, Cano-Gomez *et al.*, 2015). En revanche, d'après nos connaissances, aucun oligonucléotide n'avait été élaboré sur le gène *mreB* et nous avons ainsi dû les mettre au point (**Chapitre II, Article 1**).

Afin d'évaluer la spécificité des amorces ciblant respectivement les gènes *toxR*, *topA* et *mreB*, nous nous sommes efforcés d'inclure une grande variété de souches dans notre étude. Ainsi, contrairement à la plupart des études, la quasi-totalité des espèces appartenant au clade Harveyi, c'est-à-dire *V. alginolyticus*, *V. azureus*, *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. jasicida*, *V. mytili*, *V. natriegens*, *V. owensii*, *V. parahaemolyticus*, et *V. rotiferianus*, ont été incorporées. De plus, afin de couvrir au maximum la diversité génétique de l'espèce, nous avons inclus une grande variété de souches de *V. harveyi* d'origines géographiques et épidémiologiques différentes. Ainsi, des souches isolées de mollusques (huitres, ormeaux), de crustacés (amphipodes, crevettes), de poissons (bars communs, daurades royales, maquereaux, requins) ou d'eau de mer, couvrant une large zone géographique (Bahamas, Espagne, France, Japon, Mexique, Thaïlande, USA) ont été intégrées. Les résultats ont démontré une bonne exclusivité pour les 3 paires d'amorces. En revanche, plusieurs résultats faux négatifs ont révélés une diversité génétique des gènes *toxR* et *topA* au sein de l'espèce *V. harveyi* et une bonne conservation des séquences du gène *mreB*. C'est ainsi que la cible génétique *mreB* nous est apparue la plus adaptée dans le cadre de notre étude. Cette cible semble prometteuse pour l'identification de souches de *V. harveyi* d'origines très variées et pourrait ainsi être utilisée dans différentes études, relatives à d'autres secteurs aquacoles ou au milieu naturel.

Cette cible génétique a notamment permis de mettre en lumière deux erreurs d'identification concernant les souches de collections LMG 10946 et LMG 10947 (**Chapitre II, Article 1**). Ces souches avaient été auparavant identifiées comme *V. harveyi* mais la PCR ciblant le gène *mreB* était négative. D'autres analyses telles que le séquençage des gènes *ftsZ*, *recA* et *gyrB* ainsi que le séquençage du génome entier, nous ont alors permis de reclasser la souche LMG 10946 comme *V. campbellii* et la souche LMG 10947 comme *V. owensii*. Ces erreurs sont régulièrement relevées dans la littérature. Ainsi, Hoffmann *et al.* (2012) ont démontré que les souches LMG 16862 et

LMG 16863, auparavant identifiées comme *V. harveyi*, appartiennent en réalité à l'espèce *V. campbellii* et la souche LMG 4043 identifiée comme *V. harveyi* appartient à l'espèce *V. owensii*. La découverte progressive de ces erreurs s'explique par le développement de nouvelles technologies disposant d'un pouvoir de résolution de plus en plus conséquent. Ces technologies ont permis de faire évoluer la taxonomie des *Vibrio* et il est fort probable que la démocratisation du séquençage du génome entier, de par une réduction progressive de coûts, puisse profondément transformer la taxonomie, telle qu'on la connaît aujourd'hui (Urbanczyk *et al.*, 2013b, Bayliss *et al.*, 2017). Ceci pourrait notamment améliorer le diagnostic au sein des fermes aquacoles (Bachand *et al.*, 2020).

La quantification des espèces potentiellement pathogènes, directement dans des échantillons d'origine aquacole, est primordiale à l'établissement d'un diagnostic rapide et fiable lors de l'émergence d'une maladie, afin de rapidement mettre en œuvre des traitements thérapeutiques ciblés. De même, celle-ci est indispensable à la surveillance des agents pathogènes présents ou émergents au sein de la structure aquacole afin d'établir une stratégie prophylactique adaptée. La PCR en temps réel possède ainsi l'avantage d'être rapide, fiable, peu coûteuse et de quantifier les bactéries potentiellement pathogènes en état VNC, non détectables *via* les méthodes culturales. En revanche, cette méthode destructrice ne permet pas l'isolement et la conservation des différentes souches présentes au sein de la ferme. La collecte de ces souches trouve tout son intérêt dans l'étude phénotypique et génotypique ainsi que dans l'étude des mécanismes de virulence en relation avec l'environnement. Ces études peuvent ainsi permettre d'apporter une meilleure connaissance du fonctionnement des bactéries et d'élaborer des stratégies de contrôle.

1.2. Le MALDI-TOF MS

La technologie MALDI-TOF MS permet l'identification rapide de l'ensemble des isolats présents dans un échantillon, suite à un isolement sur milieu gélosé, voire après conservation. L'avantage par rapport à l'étude d'une seule cible génétique repose sur l'analyse de la bactérie entière et non d'une unique partie du génome, permettant, dans certains cas, une meilleure résolution à l'espèce (Clark *et al.*, 2013). L'identification repose sur la comparaison d'un spectre de masse avec des

spectres de masse de référence (MSPs) enregistrés dans une base de données. Les bases de données commerciales, telles que Bruker BioTyper, ont été initialement conçues pour une utilisation clinique, et manquent donc de spectres de référence de souches environnementales ou vétérinaires (Emami *et al.*, 2012). En effet, comme démontré lors de ces travaux de thèse, cette base de données n'est pas adaptée au criblage de souches d'origine aquacole. Nous avons ainsi dû créer notre propre base de données, la Luvibase, afin d'identifier rapidement des souches isolées sur Aquanord-Ichtus (**Chapitre III, Article 2**).

La Luvibase a été élaborée avec 23 souches de collection appartenant aux espèces *V. alginolyticus*, *V. azureus*, *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. jasicida*, *V. natriegens*, *V. owensii*, *V. parahaemolyticus*, *V. rotiferianus* et *V. sinaloensis*. La plus-value de cette base de données a été évaluée et validée par l'identification de 62 souches de collection et isolats d'origines épidémiologiques et géographiques différentes. L'implémentation de la Luvibase dans la base de données Bruker BioTyper, a permis une identification fiable à l'espèce pour 100 % des bactéries, contre 75,3 % pour la Bruker BioTyper seule. Cette implémentation a notamment permis l'identification fiable au niveau de l'espèce, de souches appartenant au clade Harveyi. Nous avons envisagé différents moyens afin de rendre cette base de données la plus accessible. Nous avons, dans un premier temps, publié la Luvibase en *Open Access* (Mougin *et al.*, 2020b). En parallèle et dans la même optique, nous avons envisagé la possibilité d'ajouter cette base de données aux bases de données largement utilisées. Ainsi, nous avons contacté l'entreprise Bruker afin d'envisager l'inclusion de la Luvibase dans la base de données Bruker BioTyper, ce qui permettrait un accès facile et standardisé pour tout utilisateur. Nous sommes actuellement en pourparlers avec les commerciaux de cette entreprise.

A l'avenir, il serait intéressant d'incrémenter la Luvibase avec de nouvelles souches de collection voire des souches environnementales bien caractérisées et isolées sur Aquanord-Ichtus. Par exemple, nous avons isolé dans les bassins aquacoles de nombreuses bactéries appartenant à l'espèce *Photobacterium damsela*, potentiellement pathogènes pour le bar commun (Essam *et al.*, 2016), (**Chapitre IV, Article 3**). Nous n'avons pas pu identifier ces bactéries jusqu'à la

sous-espèce puisqu'à ce jour, la base de données Bruker BioTyper ne permet pas la différenciation de *P. damselae* subsp. *damselae* et *P. damselae* subsp. *piscicida* (Pérez-Sancho *et al.*, 2016). Ces deux sous-espèces diffèrent par leur pathogénie et leur virulence. La sous-espèce *piscicida* est responsable de la pasteurellose, une infection aiguë entraînant des mortalités de masse chez les poissons, alors que la sous-espèce *damselae* est associée à des infections plus sporadiques. La différenciation de ces deux sous-espèces trouve donc tout son intérêt dans le diagnostic d'espèces potentiellement pathogènes pour le bar commun, afin de mettre en place des mesures de contrôle ciblées et appropriées. Une fois ces sous-espèces bien différenciées, par séquençage par exemple, nous pourrions donc enregistrer leur profil de spectres de masse dans la Luvibase.

La technologie MALDI-TOF MS a séduit de nombreux chercheurs de par sa rapidité, son faible coût, sa possibilité de haut débit et son caractère automatisable. Cette technologie est ainsi largement utilisée comme outil de diagnostic permettant l'identification de bactéries, obtenues à partir d'une culture bactérienne sur milieu solide. Ces dernières années, cette technologie a été optimisée afin d'analyser des cultures bactériennes en milieu liquide ou encore d'analyser directement l'échantillon (Hou *et al.*, 2019). Ces analyses requièrent un traitement préalable de l'échantillon afin d'éliminer les composés pouvant interférer ou inhiber l'analyse. De bons résultats ont été obtenus pour des échantillons d'urine (Ferreira *et al.*, 2010), de liquide céphalorachidien (Segawa *et al.*, 2014) ou encore d'hémoculture (La Scola et Raoult, 2009). Généralement, ces échantillons doivent renfermer une concentration bactérienne relativement élevée et présenter une contamination mono-microbienne, afin d'obtenir des résultats fiables. Ces méthodes ont été optimisées pour le traitement d'échantillons cliniques mais il serait intéressant d'extrapoler celles-ci au traitement d'échantillons environnementaux ou dans un contexte vétérinaire. Bien que le traitement de ces échantillons soit plus complexe de par la présence d'un cocktail de bactéries, il est tout à fait plausible que, grâce à de futures avancées technologiques, l'analyse MALDI-TOF puisse être directement réalisée, sans étape préalable, sur des échantillons environnementaux et plus particulièrement d'origine aquacole.

1.3. Comparaison synthétique des différentes méthodes utilisées

Le Tableau 9 permet de comparer les différentes méthodes utilisées au cours de ces travaux de thèse, c'est-à-dire la PCR en temps réel, le MALDI-TOF MS et le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S.

Tableau 9 : Comparaison des méthodes d'identification développées et/ou testées au cours de ces travaux de thèse.

Méthodes	Etapes et temps de procédures	Avantages	Inconvénients
PCR en temps réel	Extraction d'ADN	<1 h	Nécessité d'un personnel qualifié Coût important au quotidien Mise au point fastidieuse Nécessité de mettre au point des amorces spécifiques pour chaque espèce
	Préparation de la réaction et PCR en temps réel	<1 h	
	Total	<2 h	
MALDI-TOF MS	Culture bactérienne	24 h	Faible coût et facilement applicable au quotidien Simple et automatisée Haut-débit Possibilité de créer facilement sa propre base de données pour optimiser l'identification Mise à jour régulière des bases de données Possibilité de typage épidémiologique des souches
	Préparation de la cible	<3 min	
	Passage de la cible et comparaison avec les bases de données	<5 min	
	Total	~ 24 h	
Séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S	Culture bactérienne	24 h	Méthode de référence pour l'identification bactérienne utilisée par de nombreux laboratoires Bases de données bien incrémentées
	Extraction d'ADN	<1 h	
	Réaction de PCR	2-3 h	
	Révélation sur gel d'électrophorèse	1 h	
	Séquençage	24-48 h	
	Traitement des séquences et comparaison avec les bases de données	1 h	
	Total	>48 h	
		Coût de l'appareil Manque de profils de référence d'origine environnementale dans les bases de données commerciales Difficulté de traiter certains microorganismes (bactéries Gram + et mycobactéries) en raison d'une résistance à la lyse Nécessité de standardisation au sein des laboratoires Incapacité de détecter des bactéries en état VNC sans enrichissement	
		Coût important Faible pouvoir de résolution pour certaines espèces dont celles appartenant au clade Harveyi Nécessité d'un personnel qualifié Fastidieux et long Difficulté d'application au quotidien Incapacité de détecter des bactéries en état VNC sans enrichissement	

2. Etude de la dynamique des *Vibrio* potentiellement pathogènes

La 2^{ème} étape de mes travaux a consisté en l'étude de la distribution spatio-temporelle et de la structure des populations bactériennes potentiellement pathogènes pour le bar commun au sein de la ferme aquacole Aquanord-Ichtus (**Chapitre IV, Article 3**).

Le schéma fonctionnel et architectural d'Aquanord-Ichtus est atypique. La ferme est alimentée par deux entrées d'eau de mer, une entrée d'eau froide provenant de l'environnement naturel marin et une entrée d'eau chaude provenant du système de refroidissement de la CNPE. Une précédente étude a mis en avant une abondance plus importante de bactéries du genre *Vibrio* au point de rejet de la ferme et de la CNPE, que dans l'environnement naturel (Antajan *et al.*, 2019). Ainsi plusieurs hypothèses ont émergé concernant l'origine de la contamination par *Vibrio* :

- les bactéries du genre *Vibrio* étant ubiquitaires du milieu marin, elles sont naturellement apportées par l'arrivée d'eau froide au sein de la ferme et les conditions d'élevage dans les bassins entraînent une prolifération des bactéries du genre *Vibrio*
- la hausse des températures générée par le passage de l'eau dans la CNPE entraîne une multiplication des bactéries du genre *Vibrio*, directement libérées dans la ferme
- les bactéries du genre *Vibrio* peuvent former des biofilms sur la paroi des bassins d'élevage, entraînant une persistance des souches dans les bassins

Afin d'apporter des éléments de réponse, une campagne d'échantillonnage a été entreprise d'avril à octobre 2018. Un total de 609 échantillons, dont 465 échantillons d'eau et 164 échantillons de biofilms, ont été collectés dans 3 bassins d'Aquanord-Ichtus et des échantillons d'eau ont été collectés au niveau des arrivées d'eau chaude et d'eau froide alimentant la ferme. Les outils méthodologiques mis au point et détaillés dans les **Chapitre II, Article 1** et **Chapitre III, Article 2** ont été utilisés pour évaluer la distribution spatio-temporelle de l'espèce *V. harveyi* ainsi que l'évolution de la structure des populations de Vibrionaceae cultivables à 37 °C. Par ailleurs, en parallèle de ces travaux de thèse, cette campagne d'échantillonnage a également été

utilisée afin de suivre l'évolution de la population bactérienne totale, par séquençage haut débit (next-generation sequencing, NGS). Ce travail a été réalisé par la post-doctorante Roxane Roquigny et a été valorisé par un article, publié dans *Aquaculture* (Roquigny *et al.*, 2021) et disponible en Annexe 2, p.275 (Article 5).

Occurrence et abondance d'espèces potentiellement pathogènes Cette campagne d'échantillonnage a permis de mettre en évidence que plusieurs espèces de *Vibrio*, potentiellement pathogènes pour le bar commun, sont présentes dans les arrivées d'eau et dans les bassins d'élevage, pendant une grande partie de l'année. Ces agents pathogènes peuvent subsister, non seulement sous forme planctonique mais également sous forme de biofilms. Quelques études similaires avaient déjà été entreprises dans des élevages de bars communs mais celles-ci se focalisaient surtout sur la contamination de l'eau d'élevage et non sur la persistance sous forme de biofilms (Martins *et al.*, 2018, Duarte *et al.*, 2019). Les espèces potentiellement pathogènes pour le bar commun que nous avons identifiées sont *P. damsela*, ou encore *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. owensii* et *V. rotiferianus*, appartenant au clade Harveyi (Ghittino *et al.*, 2003, Kahla-Nakbi *et al.*, 2006, Korun et Timur, 2008, Essam *et al.*, 2016). Les espèces *V. harveyi*, *V. owensii* et *V. rotiferianus* avaient déjà été isolées et identifiées chez des poissons moribonds en 2017, néanmoins, *V. harveyi* restait l'espèce la plus fréquemment isolée. Il existe également un autre agent pathogène au sein d'Aquanord-Ichtus, *V. anguillarum*, qui n'a pas été isolé lors de notre étude. En effet, le risque associé à *V. anguillarum* étant aujourd'hui bien contrôlé grâce à l'administration d'un vaccin commercialisé, nos travaux ont principalement porté sur les espèces appartenant au clade Harveyi et plus particulièrement *V. harveyi*. Ainsi les conditions de cultures ont été adaptées afin de favoriser la croissance de ces espèces, impliquant une température de croissance de 37 °C, alors que la température optimale de croissance de *V. anguillarum* est de 25 °C.

Il est fort probable que l'abondance de ces agents potentiellement pathogènes dans l'environnement soit corrélée à leur prévalence chez le bar commun, bien que, pour des raisons éthiques, nous n'avons pas pu réaliser un échantillonnage sur les poissons. En effet, selon l'étude

de Kim et Lee (2017) l'augmentation de l'abondance de bactéries du genre *Vibrio* dans les bassins aquacoles est corrélée à une augmentation de la prévalence chez les poissons. De même, selon Albert et Ransangan (2013) l'abondance dans les biofilms peut être corrélée à la mortalité de poissons. Ainsi, l'occurrence de ces agents potentiellement pathogènes dans l'eau d'élevage et les biofilms peut donc augmenter le risque de déclenchement d'un épisode de vibriose. Cela dit, les abondances sont, par ailleurs influencées par des fluctuations environnementales.

Impact des facteurs environnementaux L'analyse des corrélations a permis de déceler une corrélation entre la température et l'abondance de *V. harveyi* et plus généralement des Vibrionaceae cultivables à 37 °C, non seulement dans l'eau d'élevage mais également dans les biofilms. Cette corrélation positive est largement décrite dans la littérature pour différentes espèces du genre *Vibrio* (Pereira *et al.*, 2011, Johnson *et al.*, 2012, Takemura *et al.*, 2014, Siboni *et al.*, 2016, Davis *et al.*, 2017). Dans les années à venir, une augmentation de l'occurrence et de l'abondance de ces bactéries est envisagée en lien avec l'augmentation de la température de l'eau, due au réchauffement climatique (Travers *et al.*, 2009, Baker-Austin *et al.*, 2013, Vezzulli *et al.*, 2015, Baker-Austin *et al.*, 2017). Ceci est d'autant plus préoccupant qu'une récente étude a démontré que cette augmentation de température pouvait également induire une augmentation de l'expression des facteurs de virulence chez l'espèce *V. harveyi* (Montánchez *et al.*, 2019). De plus, les changements environnementaux causés par le réchauffement climatique pourraient également affecter le système immunitaire et l'état physiologique de l'hôte, le rendant plus sensible à une infection (Cheng *et al.*, 2004, Cheng *et al.*, 2005, Dittmar *et al.*, 2014, Zha *et al.*, 2017, Reverter *et al.*, 2020). Néanmoins, à ce jour, selon nos connaissances, cela n'a pas encore été démontré chez le bar commun.

A l'échelle d'Aquanord-Ichtus, ceci est d'autant plus préoccupant que lors des mois estivaux, la ferme est uniquement alimentée par le canal d'eau froide, provenant de l'environnement naturel. Ceci signifie que toute la ferme est dépendante de la température de l'eau environnante, et qu'il n'y a, à ce jour, aucun moyen de la refroidir. L'ensemble de la ferme est donc directement

vulnérable face au réchauffement climatique, particulièrement l'été, lorsque le risque de vibriose est maximal.

Les biofilms, réservoirs d'espèces potentiellement pathogènes La présence de *V. harveyi* sous forme de biofilms est d'autant plus préoccupante que ces derniers peuvent conférer une résistance aux flux environnementaux, aux antibiotiques et aux désinfectants (Karunasagar *et al.*, 1996, Bourne *et al.*, 2006), augmentant le risque d'échec thérapeutique. La présence de ces biofilms peut donc induire une persistance de *V. harveyi* dans les bassins aquacoles et augmenter le risque de déclenchement d'épisodes de vibriose récurrents. Ce risque est également renforcé par le mécanisme de quorum sensing (QS), pouvant réguler l'expression de facteurs de virulence au sein de la communauté bactérienne composant le biofilm. Par exemple, De Decker *et al.* (2013) ont démontré que l'espèce *V. splendidus* était capable de produire un auto-inducteur (AI) pouvant activer l'expression de métalloprotéases chez d'autres espèces de *Vibrio*.

Toutefois, d'autres facteurs doivent être pris en compte pour considérer le risque de vibriose (Defoirdt *et al.*, 2011). En effet, comme nous l'avons démontré lors de notre étude, bien que des espèces potentiellement pathogènes aient été détectées toute l'année, aucun épisode de vibriose ne s'est déclenché au cours de la campagne d'échantillonnage. Plusieurs éléments peuvent expliquer ceci, tels que l'efficacité du nouvel auto-vaccin prodigué par Aquanord-Ictus, une meilleure résistance des poissons liée à la génétique ou aux conditions environnementales ou la pathogénie et la virulence des souches présentes (Vazzana *et al.*, 2002, Defoirdt *et al.*, 2011).

3. Perspectives

Ces travaux de thèse ont permis de répondre à plusieurs objectifs fixés. Ils ont notamment abouti à la conception d'une banque d'isolats bactériens, comprenant à ce jour plus d'un millier d'isolats d'origine aquacole, provenant d'échantillons d'eau et de biofilms, identifiés par MALDI-TOF MS. Néanmoins, ce travail a également permis de soulever de nouvelles interrogations vis-à-vis, par

exemple, de la pathogénie et de la virulence des souches collectées. Par conséquent, dans la continuité de ces travaux, l'objectif à court terme serait de caractériser ces différents isolats.

3.1. Caractérisation des différentes souches

3.1.1. Typage bactérien par MALDI-TOF MS

Dans un premier temps, un typage de l'ensemble des souches récoltées pourrait être réalisé. Cela nous permettrait de déterminer le nombre de souches différentes parmi notre banque d'isolats, ainsi que d'évaluer l'évolution spatiale et temporelle de l'occurrence de chaque souche collectée. Pour cela, plusieurs méthodes moléculaires sont généralement employées afin d'étudier la variabilité des souches telles que la PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), la MLST (MultiLocus Sequence Typing) ou la rep-PCR (repetitive extragenic palindromic PCR). Néanmoins, ces méthodes sont longues, coûteuses et fastidieuses. Une alternative émergente à ces différentes techniques repose sur la technologie MALDI-TOF, déjà utilisée au cours de ces travaux de thèse (Sandrin *et al.*, 2013). L'absence/présence ou la variation de certains signaux de masse peuvent permettre d'identifier des biomarqueurs spécifiques permettant la différenciation des souches au sein d'une même espèce. En effet, bien que les séquences des gènes codant pour des protéines ribosomales soient bien conservées, quelques variations nucléotidiques peuvent générer une variation de poids moléculaire chez ces protéines. Ces variations génèrent des signaux de masse différents, pouvant être utilisés afin de comparer des souches d'une même espèce, sans toutefois impacter l'identification de celle-ci (Sauget *et al.*, 2017). Grâce à cette méthode, il est ainsi possible de distinguer deux sérotypes différents. Par exemple, les différents sérotypes de l'espèce *Flavobacterium psychrophilum*, espèce pathogène affectant les salmonidés, ont pu être différenciés grâce à la caractérisation de biomarqueurs distincts (Fernández-Álvarez *et al.*, 2018).

La technique de MALDI-TOF MS est également prometteuse pour la caractérisation de la pathogénie, voire de la résistance aux antibiotiques des différentes souches (Hrabák *et al.*, 2013). Par exemple, des différences dans le signal de masse généré par la protéine OmpU ont permis de

distinguer les souches de *Vibrio cholerae* O1/O139 responsables d'épidémies, des souches moins virulentes (Paauw *et al.*, 2014). Une récente étude portant sur *Vibrio tapetis*, un agent affectant les palourdes japonaises (*Ruditapes philippinarum*), a également montré que cette technique pouvait permettre de discriminer les souches de *V. tapetis* pathogènes des souches non pathogènes (Rahmani *et al.*, 2020). La mise en place de telles méthodes s'avère toutefois longue et fastidieuse.

Quand les différentes souches seront identifiées et discriminées, les éventuels duplicatas présents dans notre collection, pourraient être écartés et les expérimentations suivantes pourraient être menées sur un nombre plus restreint de souches. Nous pourrions alors évaluer leur résistance aux antibiotiques, ainsi que leur pathogénie et leur virulence, entre autre, grâce à des méthodes moléculaires applicables en haut débit, dans le but de déterminer le risque pour l'animal et l'Homme.

3.1.2. Résistance aux antibiotiques, pathogénie et virulence

Les fermes aquacoles sont des réservoirs de gènes de résistance aux antibiotiques, représentant une menace pour la santé animale et la santé publique (Igbinsosa, 2016). Afin d'évaluer le risque de propagation de ces gènes, nous pourrions déterminer la présence de ceux-ci chez les différentes souches collectées. Par exemple, sachant que l'antibiotique utilisé à ce jour au sein d'Aquanord-Ictus est l'oxytétracycline, il serait particulièrement intéressant d'évaluer la susceptibilité de ces souches à cet antibiotique. Des résistances à l'oxytétracycline, ainsi que le gène associé *tet(34)*, ont déjà été mis en évidence chez des bactéries du genre *Vibrio*, dans des élevages de crevettes (Kim *et al.*, 2003, Rebouças *et al.*, 2011, Yano *et al.*, 2011).

En parallèle, la présence de gènes impliqués dans la pathogénie et la virulence pourrait également être évaluée. Bien que le mécanisme de pathogénie de *V. harveyi* ne soit, à l'heure actuelle, pas complètement connu (Zhang *et al.*, 2020), certains gènes codant pour des facteurs de virulence, tels que *chiA*, *flaB*, *luxR*, *toxR_{vh}*, *ser*, *vhh*, *vhpA*... sont supposés impliqués (Ruwandepika *et al.*, 2010, Xu *et al.*, 2017, Peeralil *et al.*, 2020). De plus, selon Travers (2008), la pathogénie de *V. harveyi* pour l'ormeau (*Haliotis tuberculata*) est liée à la présence du plasmide pVCR1. Il

serait ainsi intéressant de rechercher la présence de celui-ci et de potentiellement identifier un marqueur de pathogénie commun à plusieurs espèces. D'autre part, en raison d'un transfert horizontal de gènes important chez les bactéries du genre *Vibrio*, des gènes plus fréquemment rencontrés chez des espèces pathogènes pour l'Homme pourraient être ciblés, comme cela a été effectué dans les travaux de [Ruwandeeepika et al. \(2010\)](#). Cette étude a notamment permis de mettre en évidence chez *V. harveyi*, la présence des gènes *hlyA* et *toxR_{VC}*, généralement identifiés chez *V. cholerae*. Cela permettrait d'apporter de nouveaux éléments au regard du risque pour l'animal, ainsi que pour l'Homme.

A première vue, en raison du grand nombre d'isolats et de gènes à tester, nous pourrions réaliser ces expérimentations en collaboration avec l'Anses *via* la plateforme IdentityPath, disposant d'appareils de pointe, en biologie moléculaire, utilisables en haut débit. Notamment, les systèmes BioMark HD™ et LightCycler® 1536 permettent la détection simultanée de plusieurs centaines de gènes et pourraient ainsi être utilisés dans le cadre de notre étude, afin d'identifier simultanément la présence de gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques et la pathogénie.

Toutefois, la seule présence de ces gènes ne suffit pas à caractériser la pathogénie de *V. harveyi* ([Ruwandeeepika et al., 2010](#), [Peeralil et al., 2020](#)). Ainsi, il serait, dans un deuxième temps, nécessaire de caractériser la pathogénie des souches grâce à des tests *in vivo*. Pour cela, un partenariat pourrait être mis en place avec le département aquaculture de la plate-forme d'innovation Nouvelles Vagues située à Wimereux. Cette plate-forme dispose d'une infrastructure spécialisée, permettant entre autres, de réaliser des challenges bactériens. Ces challenges pourraient être réalisés par balnéation, de plusieurs concentrations bactériennes. Lors de la campagne d'échantillonnage, la concentration de Vibrionaceae cultivables à 37 °C dans les bassins oscillait entre 2.28×10^3 et 1.74×10^5 UFC.mL⁻¹ et la concentration de *V. harveyi* détectée, oscillait entre 3.72×10^1 et 9.51×10^1 GE.mL⁻¹. Nous pourrions alors tester 3 concentrations de *V. harveyi* : 10^2 , 10^4 et 10^6 UFC.mL⁻¹ et suivre l'éventuel développement de la vibriose chez le bar commun. Enfin, afin d'apporter des éléments de compréhension sur le mécanisme de pathogénie de

V. harveyi pour le bar commun, il serait intéressant de suivre l'évolution de l'expression de différents gènes impliqués dans la virulence par RT-PCR, comme cela a été réalisé sur des larves de crevettes par [Peeralil *et al.* \(2020\)](#) ou [Ruwandeeepika *et al.* \(2011\)](#). Selon nos connaissances, ce genre d'expérimentation n'a encore jamais été réalisé sur le bar commun.

La virulence et la persistance des bactéries étant également associées à la formation de biofilm, nous pourrions évaluer la capacité des souches, caractérisées comme pathogènes pour le bar commun, à former des biofilms, dans l'objectif de mettre en place des moyens de lutte contre la formation de ces biofilms.

3.2. Etude de la capacité de formation de biofilms

La mise en place d'un protocole d'étude de la capacité des souches à former un biofilm a été initiée lors de ces travaux de thèse. Suite au nombre important d'isolats que nous avons récoltés sur Aquanord-Ictus, il était nécessaire d'utiliser des méthodes rapides, applicables en haut débit, standardisées et reproductibles. Après des essais chronophages et difficilement reproductibles, en employant la technique de coloration au cristal violet (CV), le Biofilm Ring Test® (BRT), développé par BioFilm Control, partenaire du projet FEAMP LUVIBAR, s'est imposé comme la méthode de prédilection. Bien qu'à l'heure actuelle l'étude soit toujours en cours, des essais préliminaires, réalisés sur quelques isolats, ont été présentés dans ces travaux de thèse. A terme, cette première partie de l'étude permettrait de caractériser la formation de biofilms des différentes souches et de les classer en fonction de la vitesse d'initiation de la formation du biofilm, ainsi qu'en fonction de la force d'adhésion.

Par la suite, la deuxième partie de l'étude porterait sur l'impact de composés anti-biofilms sur l'initiation précoce de l'adhésion bactérienne. Cette étude sera réalisée en partenariat avec le laboratoire Membranes et Cibles Thérapeutiques (MCT) au sein de la faculté de pharmacie de l'Université Aix-Marseille, également partenaire du projet FEAMP LUVIBAR. Nous pourrions, pour cela utiliser l'Antibiofilmogram® reposant sur une technologie adaptée du BRT et permettant de déterminer la cinétique de formation de biofilms d'une culture bactérienne soumise

à différentes concentrations de molécules inhibitrices. Plus particulièrement, ce dispositif est reconnu pour sa capacité à déterminer, de façon standardisée, la Concentration Minimale Inhibitrice du biofilm (CMIb) (Tasse *et al.*, 2016). Cette étude permettrait de faire un premier criblage de composés à activité anti-biofilm.

Dans un souci d'écodéveloppement, ces composés seraient préférentiellement d'origine naturelle, non toxiques et dans notre cas, isolés du milieu marin. Par exemple, des substances produites par les bactéries marines elles-mêmes pourraient être testées (Desriac *et al.*, 2018). Des études ont démontré que les produits extracellulaires sécrétés par la souche *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, dépourvus d'activité anti-bactérienne, avaient une activité anti-biofilm pour l'espèce *V. tapetis*, également problématique dans le secteur aquacole (Dheilly *et al.*, 2010, Rodrigues *et al.*, 2015). Depuis, l'altérocine, présente dans ces produits extracellulaires, a été identifiée comme responsable de cette activité (Jouault *et al.*, 2020). Ainsi, l'activité anti-biofilm de cette protéine pourrait éventuellement être testée pour des souches de *V. harveyi*. Différentes substances isolées de spongiaires, d'algues ou de plantes halophytes ont également démontré des propriétés anti-biofilms (Stowe *et al.*, 2011, Kong *et al.*, 2014, Le Norcy *et al.*, 2017b, Vishwakarma et Sirisha, 2020). Par exemple, il a récemment été démontré que le dibromohemibastadin-1 (DBHB), isolé chez l'éponge *Ianthella basta*, présente une activité anti-biofilm et anti-quorum sensing (QS), tout en étant dépourvu d'activité anti-bactérienne (Le Norcy *et al.*, 2017b).

Bien que l'Antibiofilmogram[®] soit une technologie *in vitro* rapide et standardisée, les conditions de formation du biofilm sont très différentes de celles retrouvées *in vivo*, et plus particulièrement dans les bassins d'Aquanord-Ichtus. Par exemple, les tests précédemment présentés sont réalisés en conditions statiques or les bassins aquacoles sont soumis à des flux, principalement générés par le renouvellement d'eau. Une fois le criblage des composés anti-biofilm réalisé, nous pourrions donc compléter cette étude en déterminant leur action en conditions dynamiques, par exemple en chambre à flux, et en réalisant potentiellement des cultures mixtes, afin de se rapprocher des conditions environnementales (Tolker-Nielsen et Sternberg, 2014, Azeredo *et al.*, 2017).

Néanmoins, à l'échelle d'Aquanord-Ictus, ces composés anti-biofilms devraient être ajoutés directement dans l'eau. Or la ferme étant un système semi-ouvert, les flux au sein des bassins d'élevage sont conséquents. Afin de garantir une quantité suffisante de substances anti-biofilms, celles-ci devraient être constamment renouvelées, générant des coûts importants. Il serait donc intéressant d'incorporer ces composés anti-biofilms dans des revêtements, recouvrant la paroi des bassins aquacoles. Des études pourraient alors être réalisées directement dans les bassins. Pour cela, ce revêtement pourrait être incorporé à la surface des morceaux de béton et immergés directement dans les bassins aquacoles à l'aide du dispositif mis au point dans le **Chapitre II**. Ce dispositif pourrait être optimisé afin de couvrir l'ensemble de la hauteur de la paroi des bassins, en immergeant des morceaux de béton à différentes profondeurs. Nous pourrions par exemple tester le DBHB, précédemment cité, qui s'est avéré efficace contre la formation de biofilms en milieu marin, une fois incorporé sous forme de vernis, confectionné avec des polymères biodégradables, sur un support de polycarbonate. (Le Norcy *et al.*, 2017a, Le Norcy *et al.*, 2017b). L'utilisation de tels revêtements a déjà été envisagée en milieu aquacole. Par exemple, Vijayakumar *et al.* (2017) ont mis au point un revêtement (Fu-AuNPs) composé de nanoparticules d'or et de fucoïdane à activité anti-bactérienne, isolée d'une algue brune, *Fucus vesiculosus*. Ce revêtement a la capacité de réduire fortement la formation de biofilms d'*Aeromonas hydrophila*, une espèce pathogène pour le Tilapia du Mozambique (*Oreochromis mossambicus*) en milieu aquacole.

Enfin, l'impact et l'accumulation du composé anti-biofilm sélectionné, dans l'environnement devraient être déterminés. La cytotoxicité pour des cellules de poissons et l'accumulation dans les filets devraient également être étudiées. Des tests de cytotoxicité sur des cellules humaines pourraient éventuellement être réalisés. Ces études permettraient d'évaluer le risque pour l'animal, l'Homme et l'environnement, selon une approche intégrée dans le concept *One Health*.

Ainsi, sur le long terme cette étude pourrait aboutir à la mise au point d'un revêtement ou peinture antifouling et anti-biofilm, comprenant des composés à activité anti-biofilm d'origine naturelle, non toxique pour l'animal, l'Homme et l'environnement. Celui-ci devrait être utilisable

en milieu aquacole à un coût raisonnable, sans altérer la qualité des produits. Une fois intégré à la surface des bassins d'élevage, ce revêtement pourrait fortement réduire la formation de biofilms d'espèces potentiellement pathogènes pour le bar commun, permettant de réduire la mortalité sur Aquanord-Ictus.

4. Schéma de synthèse

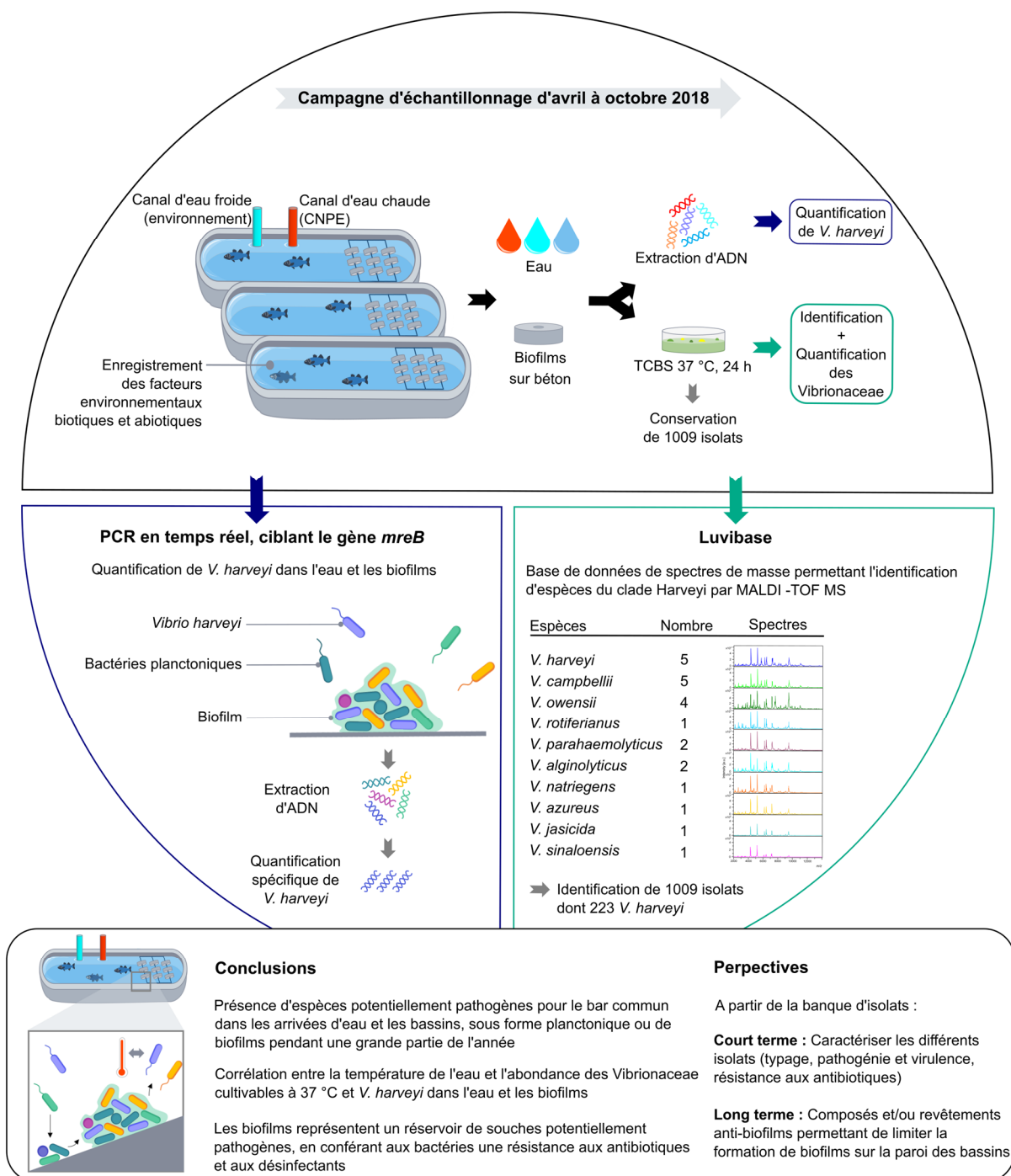


Figure 33 : Contribution du travail de thèse à une meilleure compréhension du risque *Vibrio* en environnement aquacole.

Valorisation des travaux de thèse

Articles scientifiques publiés dans des journaux à comité de lecture

Mougin, J., Flahaut, C., Roquigny, R., Bonnin-Jusserand, M., Grard, T. et Le Bris, C. (2020) Rapid identification of *Vibrio* species of the the Harveyi clade using MALDI-TOF MS profiling with main spectral profile database implemented with an in-house database: Luvibase. *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2020.586536 (**Article 2**)

Mougin, J., Roquigny, R., Travers, M.-A., Grard, T., Bonnin-Jusserand, M. et Le Bris, C. (2020) Development of a *mreB*-targeted real-time PCR method for the quantitative detection of *Vibrio harveyi* in seawater and biofilm from aquaculture systems. *Aquaculture*. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735337 (**Article 1**)

Mougin, J., Copin, S., Bojolly, D., Raguene, V., Robert-Pillot, A., Quilici, M.-L., Midelet-Bourdin, G., Grard, T. et Bonnin-Jusserand, M. (2019) Adhesion to stainless steel surfaces and detection of viable but non cultivable cells of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* isolated from shrimps in seafood processing environments: Stayin'alive? *Food Control*. doi: 10.1016/j.foodcont.2019.03.024 (**Article 4**)

Roquigny, R., **Mougin, J.**, Le Bris, C., Bonnin-Jusserand, M., Doyen, P. et Grard, T. (2021) Characterization of the marine aquaculture microbiome: a seasonal survey in a seabass farm. *Aquaculture*. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735987 (**Article 5**)

Copin, S., **Mougin, J.**, Raguene, V., Robert-Pillot, A., Quilici, M.-L., Midelet-Bourdin, G., Grard, T., Bonnin-Jusserand, M. (2020) Comparison of ethidium monoazide and propidium

monoazide treatment for the differentiation of viable *Vibrio* cells by qPCR. *Letters in Applied Microbiology*. doi : 10.1111/lam.13412

Articles scientifiques soumis dans des journaux à comité de lecture

Mougin, J., Roquigny, R., Flahaut, C., Bonnin-Jusserand, M., Grard, T. et Le Bris, C. Abundance and spatial patterns over time of Vibrionaceae and *Vibrio harveyi* in water and biofilm from a seabass aquaculture facility. Soumis à *Aquaculture*. (**Article 3**)

Communications orales

Mougin, J., Roquigny, R., Doyen, P., Grard, T., Bonnin-Jusserand, M., Le Bris, C. “*I will survive*”: When *Vibrio harveyi* in fish farming systems thinks he is Gloria Gaynor! WEFTA conference. 15-17 octobre 2019. Tórshavn, Îles Féroé.

Mougin J., Roquigny, R., Bonnin-Jusserand, M., Le Bris, C., Doyen, P., Grard, T. Développement d’approches moléculaires pour l’étude des populations bactériennes en environnement aquacole. Plateau analytique. Journée MARCO, 10 octobre 2019, Nausicaá, Boulogne sur mer, France.

Mougin J., Bonnin-Jusserand, M., Le Bris, C., Grard, T. Approches microbiologiques et moléculaires pour lutter contre la vibriose du bar (*Dicentrarchus labrax*). Journée des doctorants de l’Institut Charles VIOLLETTE. Juillet 2019, Lille, France.

Mougin J., Bonnin-Jusserand, M., Le Bris, C., Grard, T. Approches microbiologiques et moléculaires pour lutter contre la vibriose du bar (*Dicentrarchus labrax*). Avenir Littoral 2019, Dunkerque, France.

Communications affichées

Mougin, J., Roquigny, R., Travers, M.-A., Grard, T., Bonnin-Jusserand, M. et Le Bris, C. Finding *Vibrio harveyi*: Dynamic of bacterial proliferation in fish farming systems. Vibrio 2019 The Biology of Vibrios. 17-20 Novembre 2019. Montreal, Canada.

Ce poster s'est vu décerner le prix du **People's Choice Award in the Canadian Society of Microbiologists**.

Mougin, J., Bonnin-Jusserand, M., Le Bris, C., Grard, T. Microbiological and molecular approach to control vibriosis in seabass (*Dicentrarchus labrax*).WEFTA 2018, Lisbonne, Portugal.

Mougin, J., Bojolly, D., Copin, S., Raguene, V., Robert-Pillot, A., Grard, T., Midelet-Bourdin, G., Bonnin-Jusserand, M. Development of PMA q-PCR method for the detection and quantification of *Vibrio cholerae* within a biofilm. WEFTA 2017, Dublin, Irlande.

Mougin, J., Bojolly, D., Copin, S., Raguene, V., Robert-Pillot, A., Grard, T., Midelet-Bourdin, G., Bonnin-Jusserand, M. Etude de la survie de *Vibrio cholerae* en biofilm. SFM 2017, Paris, France.

Copin, S., **Mougin, J.**, Raguene, V., Robert-Pillot, A., Quilici, M.-L., Midelet-Bourdin, G., Grard, T., Bonnin-Jusserand, M. Comparaison de la toxicité du traitement par l'éthidium monoazide (EMA) et par le propidium monoazide (PMA) pour différencier les *Vibrio* viables par PCR en temps réel. SFM 2019, Paris, France.

Références

A

- Adnan, M., Alshammari, E., Patel, M., Ashraf, S. A., Khan, S. et Hadi, S.** (2018) Significance and potential of marine microbial natural bioactive compounds against biofilms/biofouling: necessity for green chemistry. *PeerJ* 6, p e5049. doi: 10.7717/peerj.5049.
- Aguirre-Guzmán, G., Mejia Ruíz, H. et Ascencio, F.** (2004) A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. *Aquacult. Res.* 35, 15, pp 1395-1404. doi: 10.1111/j.1365-2109.2004.01165.x.
- Akkermans, A. D., Van Elsas, J. D. et De Bruijn, F. J.** (1995) *Molecular microbial ecology manual*, Springer. I.S.B.N.: 978-94-009-0215-2.
- Alapide-Tendencia, E. V. et Dureza, L. A.** (1997) Isolation of *Vibrio* spp. from *Penaeus monodon* (Fabricius) with red disease syndrome. *Aquaculture* 154, 2, pp 107-114. doi: 10.1016/S0044-8486(97)00045-8.
- Albert, V. et Ransangan, J.** (2013) Effect of water temperature on susceptibility of culture marine fish species to vibriosis. *Int. J. Res. Pure Appl. Microbiol.* 3, 3, pp 48-52.
- Allam, B., Paillard, C. et Ford, S. E.** (2002) Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Dis. Aquat. Org.* 48, 3, pp 221-231. doi: 10.3354/dao048221.
- Almeida, J. R. et Vasconcelos, V.** (2015) Natural antifouling compounds: Effectiveness in preventing invertebrate settlement and adhesion. *Biotechnol. Adv.* 33, 3-4, pp 343-357. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.01.013.
- Alsina, M. et Blanch, A. R.** (1994) A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 1, pp 79-85.
- Amenyogbe, E., Chen, G., Wang, Z., Huang, J., Huang, B. et Li, H.** (2020) The exploitation of probiotics, prebiotics and synbiotics in aquaculture: present study, limitations and future directions: a review. *Aquacult. Int.*, pp 1-25. doi: 10.1007/s10499-020-00509-0.
- Ang, C. Y., Sano, M., Dan, S., Leelakriangsak, M. et Lal, T. M.** (2020) Postbiotics applications as infectious disease control agent in aquaculture. *Biocontrol Sci.* 25, 1, pp 1-7. doi: 10.4265/bio.25.1.
- Anguiano-Beltran, C., Searcy-Bernal, R. et Lizárraga-Partida, M. L.** (1998) Pathogenic effects of *Vibrio alginolyticus* on larvae and postlarvae of the red abalone *Haliotis rufescens*. *Dis. Aquat. Org.* 33, 2, pp 119-122. doi: 10.3354/dao033119.

- ANSES. (2010) Consommation des poissons, mollusques et crustacés: aspects nutritionnels et sanitaires pour l'homme. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Décembre 2010, Edition Scientifique.
- Antajan, E., Devreker, D., Loots, C., Rocroy, M., Alizier, S. et Ruellet, T. (2019) Surveillance écologique du site de production électronucléaire de Gravelines Novembre 2017–Octobre 2018. Ifremer R.ODE/LITTORAL/LER/BL19.02, mars 2019, 208 p.
- Applied Biosystems. (2020) Comparaison entre la chimie TaqMan et la chimie SYBR pour la PCR en temps réel. <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/taqman-vs-sybr-chemistry-real-time-pcr.html>. (Consulté le 08/08/2020)
- Arijo, S., Rico, R., Chabrillon, M., Diaz-Rosales, P., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M. C., Magariños, B., Toranzo, A. et Moriñigo, M. (2005) Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *J. Fish Dis.* 28, 1, pp 33-38. doi: 10.1111/j.1365-2761.2004.00597.x.
- Arunkumar, M., LewisOscar, F., Thajuddin, N., Pugazhendhi, A. et Nithya, C. (2020) *In vitro* and *in vivo* biofilm forming *Vibrio* sp: A significant threat in aquaculture. *Process Biochem.* 94, pp 213-223. doi: 10.1016/j.procbio.2020.04.029.
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N. et Patel, H. R. (2005) Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 5, 2, pp 209-219. doi: 10.1586/14737159.5.2.209.
- Asplund, M. E., Rehnstam-Holm, A. S., Atnur, V., Raghunath, P., Saravanan, V., Härnström, K., Collin, B., Karunasagar, I. et Godhe, A. (2011) Water column dynamics of *Vibrio* in relation to phytoplankton community composition and environmental conditions in a tropical coastal area. *Environ. Microbiol.* 13, 10, pp 2738-2751. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02545.x.
- Austin, B. et Zhang, X. H. (2006) *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 2, pp 119-124. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01989.x.
- Austin, B. (2010) Vibrios as causal agents of zoonoses. *Vet. Microbiol.* 140, 3, pp 310-317. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.015.
- Ayrapetyan, M., Williams, T. C. et Oliver, J. D. (2015) Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria. *Trends Microbiol.* 23, 1, pp 7-13. doi: 10.1016/j.tim.2014.09.004.
- Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., Desvaux, M., Di Bonaventura, G., Hébraud, M. et Jaglic, Z. (2017) Critical review on biofilm methods. *Crit. Rev. Microbiol.* 43, 3, pp 313-351. doi: 10.1080/1040841X.2016.1208146.

B

- Bachand, P. T., Tallman, J. J., Powers, N. C., Woods, M., Azadani, D. N., Zimba, P. V. et Turner, J. W. (2020) Genomic identification and characterization of co-occurring Harveyi clade species following a vibriosis outbreak in Pacific white shrimp, *Penaeus (litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture* 518, p 734628. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734628.
- Baffone, W., Citterio, B., Vittoria, E., Casaroli, A., Campana, R., Falzano, L. et Donelli, G. (2003) Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. *Int. J. Food Microbiol.* 89, 1, pp 31-39. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00102-8.
- Bahri-Sfar, L., Lemaire, C., Hassine, O. K. B. et Bonhomme, F. (2000) Fragmentation of sea bass populations in the western and eastern Mediterranean as revealed by microsatellite polymorphism. *Proc. R. Soc. London, Ser. B* 267, 1446, pp 929-935. doi: 10.1098/rspb.2000.1092.
- Baker-Austin, C., Trinanés, J. A., Taylor, N. G., Hartnell, R., Siitonen, A. et Martínez-Urtaza, J. (2013) Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. *Nat. Clim. Change* 3, 1, pp 73-77. doi: 10.1038/nclimate1628.
- Baker-Austin, C., Trinanés, J., González-Escalona, N. et Martínez-Urtaza, J. (2017) Non-cholera vibrios: the microbial barometer of climate change. *Trends Microbiol.* 25, 1, pp 76-84. doi: 10.1016/j.tim.2016.09.008.
- Ball, A. S., Chaparian, R. R. et van Kessel, J. C. (2017) Quorum sensing gene regulation by LuxR/HapR master regulators in vibrios. *J. Bacteriol.* 199, 19, pp e00105-17. doi: 10.1128/JB.00105-17.
- Bannister, J., Sievers, M., Bush, F. et Bloecher, N. (2019) Biofouling in marine aquaculture: a review of recent research and developments. *Biofouling* 35, 6, pp 631-648. doi: 10.1080/08927014.2019.1640214.
- Barua, D. (1992) History of cholera dans *Cholera*. (Barua, D., & Greenough III, W. B., Ed.), pp 1-36, Springer, Boston, MA. I.S.B.N.: 978-1-4757-9688-9.
- Bassler, B. L., Wright, M., Showalter, R. E. et Silverman, M. R. (1993) Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol. Microbiol.* 9, 4, pp 773-786. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01737.x.
- Bassler, B. L., Wright, M. et Silverman, M. R. (1994) Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol. Microbiol.* 13, 2, pp 273-286. doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00422.x.
- Basto, A., Matos, E. et Valente, L. M. (2020) Nutritional value of different insect larvae meals as protein sources for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 521, p 735085. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735085.
- Bauer, J., Teitge, F., Neffe, L., Adamek, M., Jung, A., Pepler, C., Steinhagen, D. et Jung-Schroers, V. (2018) Recommendations for identifying pathogenic *Vibrio* spp. as part of disease surveillance programmes in recirculating aquaculture systems for Pacific

- white shrimps (*Litopenaeus vannamei*). *J. Fish Dis.* 41, 12, pp 1877-1897. doi: 10.1111/jfd.12897.
- Baumann, P., Baumann, L., Bang, S. S. et Woolkalis, M. J.** (1980) Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckeia*, and *Photobacterium*: Abolition of the genus *Beneckeia*. *Curr. Microbiol.* 4, 3, pp 127-132.
- Bayliss, S. C., Verner-Jeffreys, D. W., Bartie, K. L., Aanensen, D. M., Sheppard, S. K., Adams, A. et Feil, E. J.** (2017) The promise of whole genome pathogen sequencing for the molecular epidemiology of emerging aquaculture pathogens. *Front. Microbiol.* 8, p 121. doi: 10.3389/fmicb.2017.00121
- Becker, P., Gillan, D., Lanterbecq, D., Jangoux, M., Rasolofonirina, R., Rakotovo, J. et Eeckhaut, I.** (2004) The skin ulceration disease in cultivated juveniles of *Holothuria scabra* (Holothuroidea, Echinodermata). *Aquaculture* 242, 1-4, pp 13-30. doi: 10.1016/j.aquaculture.2003.11.018.
- Bhattacharya, S., Bhattacharya, M., Nair, G. B., Dutta, D., Deb, A., Ramamurthy, T., Garg, S., Saha, P. K., Dutta, P. et Moitra, A.** (1993) Clinical profile of acute diarrhoea cases infected with the new epidemic strain of *Vibrio cholerae* O139: designation of the disease as cholera. *J. Infect.* 27, 1, pp 11-15. doi: 10.1016/0163-4453(93)93488-P.
- Bina, J., Zhu, J., Dziejman, M., Faruque, S., Calderwood, S. et Mekalanos, J.** (2003) ToxR regulon of *Vibrio cholerae* and its expression in vibrios shed by cholera patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 5, pp 2801-2806. doi: 10.1073/pnas.2628026100.
- Bonnin-Jusserand, M., Copin, S., Le Bris, C., Brauge, T., Gay, M., Brisabois, A., Grard, T. et Midelet-Bourdin, G.** (2017) *Vibrio* species involved in seafood-borne outbreaks (*Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*): Review of microbiological versus recent molecular detection methods in seafood products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 59, 4, pp 597-610. doi: 10.1080/10408398.2017.1384715
- Bordas, M. A., Balebona, M. C., Rodriguez-Maroto, J. M., Borrego, J. J. et Moriñigo, M. A.** (1998) Chemotaxis of pathogenic vibrio strains towards mucus surfaces of Gilt-Head Sea Bream (*Sparus aurata* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4, pp 1573-1575. doi: 10.1128/AEM.64.4.1573-1575.1998.
- Bostock, J., Lane, A., Hough, C. et Yamamoto, K.** (2016) An assessment of the economic contribution of EU aquaculture production and the influence of policies for its sustainable development. *Aquacult. Int.* 24, 3, pp 699-733. doi: 10.1007/s10499-016-9992-1.
- Boucher, Y. et Stokes, H. W.** (2006) The roles of lateral gene transfer and vertical descent in *Vibrio* evolution dans *The biology of vibrios*. (Thompson, F. L., Austin, B., & Swings, J., Ed.), pp 84-94, American Society of Microbiology. I.S.B.N.: 9781683671787.
- Bourne, D. G., Høj, L., Webster, N. S., Swan, J. et Hall, M. R.** (2006) Biofilm development within a larval rearing tank of the tropical rock lobster, *Panulirus ornatus*. *Aquaculture* 260, 1-4, pp 27-38. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.06.023.
- Bowman, J. P., McCammon, S. A., Brown, M. V., Nichols, D. S. et McMeekin, T. A.** (1997) Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 8, pp 3068-3078.

- Brankatschk, R., Bodenhausen, N., Zeyer, J. et Bürgmann, H. (2012) Simple absolute quantification method correcting for quantitative PCR efficiency variations for microbial community samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 12, pp 4481-4489. doi: 10.1128/AEM.07878-11.
- Brehm, T. T., Berneking, L., Rohde, H., Chistner, M., Schlickewei, C., Martins, M. S. et Schmiedel, S. (2020) Wound infection with *Vibrio harveyi* following a traumatic leg amputation after a motorboat propeller injury in Mallorca, Spain: a case report and review of literature. *BMC Infect. Dis.* 20, 1, p 104. doi: 10.1186/s12879-020-4789-2.
- Briet, A., Helsen, N., Delannoy, S., Debuiche, S., Brisabois, A., Midelet, G. et Granier, S. A. (2018) NDM-1-producing *Vibrio parahaemolyticus* isolated from imported seafood. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 9, pp 2578-2579. doi: 10.1093/jac/dky200.
- Buchmann, K., Bresciani, J., Pedersen, K., Ariel, E., Dalsgaard, I. et Madsen, L. (2009) *Fish diseases-an introduction*, Biofolia. I.S.B.N.: 8791319439.
- Buller, N. B. (2014) *Bacteria and fungi from fish and other aquatic animals: a practical identification manual*, CABI. I.S.B.N.: 1845938054.

C

- Cano-Gomez, A., Bourne, D. G., Hall, M. R., Owens, L. et Høj, L. (2009) Molecular identification, typing and tracking of *Vibrio harveyi* in aquaculture systems: Current methods and future prospects. *Aquaculture* 287, 1-2, pp 1-10. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.10.058.
- Cano-Gomez, A., Goulden, E. F., Owens, L. et Høj, L. (2010) *Vibrio owensii* sp. nov., isolated from cultured crustaceans in Australia. *FEMS Microbiol. Lett.* 302, 2, pp 175-181. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01850.x.
- Cano-Gomez, A., Høj, L., Owens, L. et Andreakis, N. (2011) Multilocus sequence analysis provides basis for fast and reliable identification of *Vibrio harveyi*-related species and reveals previous misidentification of important marine pathogens. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 8, pp 561-565. doi: 10.1016/j.syapm.2011.09.001.
- Cano-Gomez, A., Høj, L., Owens, L., Baillie, B. K. et Andreakis, N. (2015) A multiplex PCR-based protocol for identification and quantification of *Vibrio harveyi*-related species. *Aquaculture* 437, pp 195-200. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.10.050.
- Cantas, L. et Suer, K. (2014) Review: the important bacterial zoonoses in “one health” concept. *Front. Public Health* 2, p 144. doi: 10.3389/fpubh.2014.00144.
- Casadevall, A. et Pirofski, L.-A. (1999) Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.* 67, 8, pp 3703-3713. doi: 10.1128/IAI.67.8.3703-3713.1999.
- Casadevall, A. et Pirofski, L.-A. (2009) Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework. *J. Water Health* 7, S1, pp S2-S18. doi: doi.org/10.2166/wh.2009.036.

- Chatterjee, S. et Haldar, S. (2012) *Vibrio* related diseases in aquaculture and development of rapid and accurate identification methods. *J. Mar. Sci.: Res. Dev.* 1, pp 1-7. doi: 10.4172/2155-9910.S1-002.
- Chavant, P., Gaillard-Martinié, B., Talon, R., Hébraud, M. et Bernardi, T. (2007) A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J. Microbiol. Methods* 68, 3, pp 605-612. doi: 10.1016/j.mimet.2006.11.010.
- Chen, C.-Y., Wu, K.-M., Chang, Y.-C., Chang, C.-H., Tsai, H.-C., Liao, T.-L., Liu, Y.-M., Chen, H.-J., Shen, A. B.-T. et Li, J.-C. (2003) Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Res.* 13, 12, pp 2577-2587. doi: 10.1101/gr.1295503.
- Chen, X.-g., Wu, S.-q., Shi, C.-b. et Li, N.-q. (2004) Isolation and identification of pathogenetic *Vibrio harveyi* from estuary cod *Epinephelus coioides*. *J. Fish Sci. China* 11, 4, pp 313-317.
- Cheng, W., Hsiao, I.-S., Hsu, C.-H. et Chen, J.-C. (2004) Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 3, pp 235-243. doi: 10.1016/j.fsi.2004.03.007.
- Cheng, W., Wang, L.-U. et Chen, J.-C. (2005) Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture* 250, 3-4, pp 592-601. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.04.060.
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J., Baddour, L., Barrett, F., Melton, D. et Beachey, E. (1985) Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* 22, 6, pp 996-1006.
- Clark, A. E., Kaleta, E. J., Arora, A. et Wolk, D. M. (2013) Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 3, pp 547-603. doi: 10.1128/CMR.00072-12.
- Colorni, A. et Burgess, P. (1997) *Cryptocaryon irritans* Brown 1951, the cause of ‘white spot disease’ in marine fish: an update. *Aquarium Sci. Conserv.* 1, 4, pp 217-238.
- Colorni, A., Avtalion, R., Knibb, W., Berger, E., Colorni, B. et Timan, B. (1998) Histopathology of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) experimentally infected with *Mycobacterium marinum* and treated with streptomycin and garlic (*Allium sativum*) extract. *Aquaculture* 160, 1-2, pp 1-17. doi: 10.1016/S0044-8486(97)00234-2.
- Colquhoun, D., Aase, I., Wallace, C., Baklien, A. et Gravningen, K. (2004) First description of *Vibrio ordalii* from Chile. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.* 24, 4, pp 185-188.
- Company, R., Sitj, A., Bobadilla, Pujalte, M., Garay, E., Alvarez-Pellitero, P., rez-S et nchez. (1999) Bacterial and parasitic pathogens in cultured common dentex, *Dentex dentex* L. *J. Fish Dis.* 22, 4, pp 299-309. doi: 10.1046/j.1365-2761.1999.00182.x.

- Conejero, M. et Hedreyda, C. (2003) Isolation of partial *toxR* gene of *Vibrio harveyi* and design of *toxR*-targeted PCR primers for species detection. *J. Appl. Microbiol.* 95, 3, pp 602-611. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02020.x.
- Conejero, M. J. U. et Hedreyda, C. T. (2004) PCR detection of hemolysin (*vhh*) gene in *Vibrio harveyi*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 50, 3, pp 137-142. doi: 10.2323/jgam.50.137.
- Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16, 22, pp 10881-10890. doi: 10.1093/nar/16.22.10881.
- Cotou, E., Henry, M., Zeri, C., Rigos, G., Torreblanca, A. et Catsiki, V.-A. (2012) Short-term exposure of the European sea bass *Dicentrarchus labrax* to copper-based antifouling treated nets: copper bioavailability and biomarkers responses. *Chemosphere* 89, 9, pp 1091-1097. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.05.075.
- Coull, J. R. (1993) Will a blue revolution follow the green revolution? The modern upsurge of aquaculture. *Area* 25, 4, pp 350-357.
- Culot, A., Grosset, N. et Gautier, M. (2019) Overcoming the challenges of phage therapy for industrial aquaculture: A review. *Aquaculture* 513, p 734423. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734423.

D

- Dadar, M., Dhama, K., Vakharia, V. N., Hoseinifar, S. H., Karthik, K., Tiwari, R., Khandia, R., Munjal, A., Salgado-Miranda, C. et Joshi, S. K. (2017) Advances in aquaculture vaccines against fish pathogens: global status and current trends. *Rev. Fish. Sci. Aquacul.* 25, 3, pp 184-217. doi: 10.1080/23308249.2016.1261277.
- Davis, B. J., Jacobs, J. M., Davis, M. F., Schwab, K. J., DePaola, A. et Curriero, F. C. (2017) Environmental determinants of *Vibrio parahaemolyticus* in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, 21, pp e01147-17. doi: 10.1128/AEM.01147-17.
- De Decker, S., Reynaud, Y. et Saulnier, D. (2013) First molecular evidence of cross-species induction of metalloprotease gene expression in *Vibrio* strains pathogenic for Pacific oyster *Crassostrea gigas* involving a quorum sensing system. *Aquaculture* 392, pp 1-7. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.01.033.
- De Hoffmann, E. (2000) Mass spectrometry dans Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology doi: 10.1002/0471238961.1301191913151518.a01.pub2.
- De Muynck, W., De Belie, N. et Verstraete, W. (2010) Antimicrobial mortar surfaces for the improvement of hygienic conditions. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1, pp 62-72. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04395.x.
- Defoirdt, T., Boon, N. et Bossier, P. (2010) Can bacteria evolve resistance to quorum sensing disruption? *PLoS Pathog* 6, 7, p e1000989. doi: 10.1371/journal.ppat.1000989.
- Defoirdt, T., Sorgeloos, P. et Bossier, P. (2011) Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 3, pp 251-258. doi: 10.1016/j.mib.2011.03.004.
- Defoirdt, T. (2014) Virulence mechanisms of bacterial aquaculture pathogens and antivirulence therapy for aquaculture. *Rev. Aquacul.* 6, 2, pp 100-114. doi: 10.1111/raq.12030.

- Defoirdt, T. (2017) Quorum-Sensing systems as targets for antivirulence therapy. *Trends Microbiol.*, pp 1-16. doi: 10.1016/j.tim.2017.10.005.
- Del Gigia-Aguirre, L., Sánchez-Yebra-Romera, W., García-Muñoz, S. et Rodríguez-Maresca, M. (2017) First description of wound infection with *Vibrio harveyi* in Spain. *New Microbes New Infect.* 19, p 15. doi: 10.1016/j.nmni.2017.05.004.
- Desriac, F., Rodrigues, S., Doghri, I., Sablé, S., Lanneluc, I., Fleury, Y., Bazire, A. et Dufour, A. (2018) Antimicrobial and antibiofilm molecules produced by marine bacteria. *Blue Biotechnology: Production and Use of Marine Molecules* 2, pp 789-819. doi: 10.1002/9783527801718.ch25.
- Destoumieux-Garzón, D., Mavingui, P., Boëtsch, G., Boissier, J., Darriet, F., Duboz, P., Fritsch, C., Giraudoux, P., Le Roux, F. et Morand, S. (2018) The one health concept: 10 years old and a long road ahead. *Front. Vet. Sci.* 5, p 14. doi: 10.3389/fvets.2018.00014.
- Dheilly, A., Soum-Soutéra, E., Klein, G. L., Bazire, A., Compère, C., Haras, D. et Dufour, A. (2010) Antibiofilm activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain 3J6. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 11, pp 3452-3461. doi: 10.1128/AEM.02632-09.
- Di Domenico, E. G., Toma, L., Provot, C., Ascenzioni, F., Sperduti, I., Prignano, G., Gallo, M. T., Pimpinelli, F., Bordignon, V. et Bernardi, T. (2016) Development of an in vitro assay, based on the biofilm ring test[®], for rapid profiling of biofilm-growing bacteria. *Front. Microbiol.* 7, p 1429. doi: 10.3389/fmicb.2016.01429.
- Dieckmann, R., Strauch, E. et Alter, T. (2010) Rapid identification and characterization of *Vibrio* species using whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1, pp 199-211. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04647.x.
- Diggles, B., Moss, G., Carson, J. et Anderson, C. (2000) Luminous vibriosis in rock lobster *Jasus verreauxi* (Decapoda: Palinuridae) phyllosoma larvae associated with infection by *Vibrio harveyi*. *Dis. Aquat. Org.* 43, 2, pp 127-137. doi: 10.3354/dao043127.
- Dittmann, K. K., Rasmussen, B. B., Castex, M., Gram, L. et Bentzon-Tilia, M. (2017) The aquaculture microbiome at the centre of business creation. *Microb. Biotechnol.* 10, 6, p 1279. doi: 10.1111/1751-7915.12877.
- Dittmar, J., Janssen, H., Kuske, A., Kurtz, J. et Scharsack, J. P. (2014) Heat and immunity: an experimental heat wave alters immune functions in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *J. Anim. Ecol.* 83, 4, pp 744-757. doi: 10.1111/1365-2656.12175.
- Domon, B. et Aebersold, R. (2006) Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 312, 5771, pp 212-217. doi: 10.1126/science.1124619.
- Dong, H., Taengphu, S., Sangsuriya, P., Charoensapsri, W., Phiwsaiya, K., Sornwatana, T., Khunrae, P., Rattanarojpong, T. et Senapin, S. (2017) Recovery of *Vibrio harveyi* from scale drop and muscle necrosis disease in farmed barramundi, *Lates calcarifer* in Vietnam. *Aquaculture* 473, pp 89-96. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.02.005.

- Dorsch, M., Lane, D. et Stackebrandt, E. (1992) Towards a phylogeny of the genus *Vibrio* based on 16S rRNA sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 42, 1, pp 58-63. doi: 10.1099/00207713-42-1-58.
- Du, M., Chen, J., Zhang, X., Li, A. et Li, Y. (2007) Characterization and resuscitation of viable but nonculturable *Vibrio alginolyticus* VIB283. *Arch. Microbiol.* 188, 3, pp 283-288.
- Duarte, L. N., Coelho, F. J., Cleary, D. F., Bonifácio, D., Martins, P. et Gomes, N. C. (2019) Bacterial and microeukaryotic plankton communities in a semi-intensive aquaculture system of sea bass (*Dicentrarchus labrax*): A seasonal survey. *Aquaculture* 503, pp 59-69. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.12.066.
- Dupont-Nivet, M., Vandeputte, M., Vergnet, A., Merdy, O., Haffray, P., Chavanne, H. et Chatain, B. (2008) Heritabilities and GxE interactions for growth in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) using a marker-based pedigree. *Aquaculture* 275, 1-4, pp 81-87. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.12.032.

E

- Eddabra, R., Prévost, G. et Scheftel, J.-M. (2012) Rapid discrimination of environmental *Vibrio* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiol. Res.* 167, 4, pp 226-230. doi: 10.1016/j.micres.2011.09.002.
- Edwards, P. (2015) Aquaculture environment interactions: past, present and likely future trends. *Aquaculture* 447, pp 2-14. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.02.001.
- EEA. (2017) Climate change, impacts and vulnerability in Europe 2016: An indicator-based report. doi: 10.2800/534806.
- EFSA. (2016) European Food Safety Authority, Annual report of the Emerging Risks Exchange Network 2015. *EFSA Supporting Publications* 13, 7, p 1067E.
- Elston, R. A., Hasegawa, H., Humphrey, K. L., Polyak, I. K. et Häse, C. C. (2008) Re-emergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: severity, environmental drivers, geographic extent and management. *Dis. Aquat. Org.* 82, 2, pp 119-134. doi: 10.3354/dao01982.
- Emami, K., Askari, V., Ullrich, M., Mohinudeen, K., Anil, A. C., Khandeparker, L., Burgess, J. G. et Mesbahi, E. (2012) Characterization of bacteria in ballast water using MALDI-TOF mass spectrometry. *PloS one* 7, 6. doi: 10.1371/journal.pone.0038515.
- Erler, R., Wichels, A., Heinemeyer, E.-A., Hauk, G., Hippelein, M., Reyes, N. T. et Gerdt, G. (2015) VibrioBase: a MALDI-TOF MS database for fast identification of *Vibrio* spp. that are potentially pathogenic in humans. *Syst. Appl. Microbiol.* 38, 1, pp 16-25. doi: 10.1016/j.syapm.2014.10.009.
- Escudero, J. A., Loot, C. et Mazel, D. (2018) Integrons as Adaptive Devices dans *Molecular Mechanisms of Microbial Evolution*. (Rampelotto, P. H., Ed.), pp 199-239, Springer. I.S.B.N.: 978-3-319-69078-0.

- Essam, H., Abdellrazeq, G., Tayel, S., Torky, H. et Fadel, A. (2016) Pathogenesis of *Photobacterium damsela* subspecies infections in sea bass and sea bream. *Microb. Pathog.* 99, pp 41-50. doi: 10.1016/j.micpath.2016.08.003.
- EU Council Directive (EC) 2006/88/EC on animal health requirements for aquaculture animals and products thereof, and on the prevention and control of certain diseases in aquatic animals. (2006) *Official Journal of the European Union*. L328, 14-56.
- EUMOFA. (2019) Etude de cas: le bar dans l'UE. EUMOFA, *Observatoire Européen du Marché des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture*. doi: 10.2771/360372.
- EUMOFA. (2020) Monthly Highlights, No. 3. EUMOFA, *European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products*.
- Evason, D. J., Claydon, M. A. et Gordon, D. B. (2001) Exploring the limits of bacterial identification by intact cell-mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12, 1, pp 49-54. doi: 10.1016/S1044-0305(00)00192-6.

F

- Fan, W.-H., Huang, J., Wang, X.-H., Shi, C. et Liu, L. (2005) Identification and phylogenetic study of pathogenic bacteria causing ulcer disease of cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). *J. Acta Microbiol. Sin.* 45, 5, pp 665-670.
- FAO. (2018) The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome. *Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO*.
- FAO 2005-2020. National Aquaculture Sector Overview. Vue générale du secteur aquacole national - France. Texte par Lacroix, D. *Département des pêches et de l'aquaculture de la FAO*. .
- FAO FishStat. (2019) Software for Fishery and Aquaculture Statistical Time Series <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>. (Consulté le 16/03/2019)
- Farmer, J. 3rd., Hickman-Brenner, F., Fanning, G., Gordon, C. M. et Brenner, D. (1988) Characterization of *Vibrio metschnikovii* and *Vibrio gazogenes* by DNA-DNA hybridization and phenotype. *J. Clin. Microbiol.* 26, 10, pp 1993-2000.
- Farmer, J. 3rd., Michael Janda, J., Brenner, F. W., Cameron, D. N. et Birkhead, K. M. (2005) *Vibrio* Pacini 1854, 411^{AL} dans *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. (Brenner, D., Krieg, N., Staley, J., & Garrity, G., Ed.), pp 494-546, John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.
- Farmer, J. 3rd., Michael Janda, J., Brenner, F. W., Cameron, D. N. et Birkhead, K. M. (2015) *Vibrio* Pacini 1854, 411^{AL} dans *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. (Brenner, D., Krieg, N., Staley, J., & Garrity, G., Ed.), pp 1-79, John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.
- Fernández-Álvarez, C., Torres-Corral, Y. et Santos, Y. (2018) Use of ribosomal proteins as biomarkers for identification of *Flavobacterium psychrophilum* by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Proteomics* 170, pp 59-69. doi: 10.1016/j.jprot.2017.09.007.
- Ferreira, L., Sánchez-Juanes, F., González-Ávila, M., Cembrero-Fuciños, D., Herrero-Hernández, A., González-Buitrago, J. M. et Muñoz-Bellido, J. L.

- (2010) Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 48, 6, pp 2110-2115. doi: 10.1128/JCM.02215-09.
- Fioravanti, M., Caffara, M., Florio, D., Gustinelli, A. et Marcer, F.** (2006) A parasitological survey of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cultured in Italy. *Vet. Res. Commun.* 30, pp 249-252. doi: 10.1007/s11259-006-9021-3.
- Fioravanti, M. L., Caffara, M., Florio, D., Gustinelli, A. et Marcer, F.** (2004) *Sphaerospora dicentrarchi* and *S. testicularis* (Myxozoa: Sphaerosporidae) in farmed European seabass (*Dicentrarchus labrax*) from Italy. *Folia Parasitol.* 51, 2/3, p 208.
- Fischer, W., Bianchi, G. et Scott, W. B.** (1981) *FAO species identification sheets for fishery purposes. Eastern Central Atlantic: fishing area 34 and part of 47.* , Vol. 1-7, Canada Funds-in-Trust. Ottawa, Department of Fisheries and Oceans Canada, by arrangement with the Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Fitridge, I., Dempster, T., Guenther, J. et De Nys, R.** (2012) The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review. *Biofouling* 28, 7, pp 649-669. doi: 10.1080/08927014.2012.700478.
- Flegel, T., Pasharawipas, T., Owens, L. et Oakey, H.** (2005) Evidence for phage-induced virulence in the shrimp pathogen *Vibrio harveyi* dans *Diseases in Asian aquaculture V.* (Walker, P., Lester, R., & Bondad-Reantaso, M. G., Ed.), pp 329-337, Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.
- Flemming, H.-C. et Wingender, J.** (2010) The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 9, pp 623-633. doi: 10.1038/nrmicro2415.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A. et Kjelleberg, S.** (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 9, p 563. doi: 10.1038/nrmicro.2016.94.
- Floerl, O., Sunde, L. M. et Bloecher, N.** (2016) Potential environmental risks associated with biofouling management in salmon aquaculture. *Aquacult. Env. Interact.* 8, pp 407-417. doi: 10.3354/aei00187.
- Fortier, L.-C. et Sekulovic, O.** (2013) Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence* 4, 5, pp 354-365. doi: 10.4161/viru.24498.
- FranceAgriMer.** (2010) Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture.
- FranceAgriMer.** (2018) Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture.
- Francis-Floyd, R. et Floyd, M. R.** (2011) *Amyloodinium ocellatum*, an important parasite of cultured marine fish. *Southern Regional Aquaculture Center, SRAC*, 4705.
- Franco, P. F. et Hedreyda, C. T.** (2006) Amplification and sequence analysis of the full length *toxR* gene in *Vibrio harveyi*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 52, 5, pp 281-287. doi: 10.2323/jgam.52.281.
- Frans, I., Michiels, C. W., Bossier, P., Willems, K., Lievens, B. et Rediers, H.** (2011) *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *J. Fish Dis.* 34, 9, pp 643-661. doi: 10.1111/j.1365-2761.2011.01279.x.

- Frerichs, G., Rodger, H. et Peric, Z. (1996) Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *J. Gen. Virol.* 77, 9, pp 2067-2071. doi: 10.1099/0022-1317-77-9-2067.
- Froelich, B. A. et Daines, D. A. (2020) In hot water: effects of climate change on *Vibrio*-human interactions. *Environ. Microbiol.* doi: 10.1111/1462-2920.14967.
- Fujinami, Y., Kikkawa, H. S., Kurosaki, Y., Sakurada, K., Yoshino, M. et Yasuda, J. (2011) Rapid discrimination of *Legionella* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiol. Res.* 166, 2, pp 77-86. doi: 10.1016/j.micres.2010.02.005.
- Fujino, T., Okuno, Y., Nakada, D., Aoyama, A., Fukai, K., Mukai, T. et Ueho, T. (1953) On the bacteriological examination of shirasu-food poisoning. *Med. J. Osaka Univ.* 4, 2/3, pp 299-304.
- Fukui, Y. et Sawabe, T. (2008) Rapid detection of *Vibrio harveyi* in seawater by real-time PCR. *Microbes Environ.* 23, 2, pp 172-176. doi: 10.1264/jsme2.23.173.

G

- Garrett, T. R., Bhakoo, M. et Zhang, Z. (2008) Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Prog. Nat. Sci.* 18, 9, pp 1049-1056. doi: 10.1016/j.pnsc.2008.04.001.
- Ghittino, C., Latini, M., Agnetti, F., Panzieri, C., Lauro, L., Ciappelloni, R. et Petracca, G. (2003) Emerging pathologies in aquaculture: effects on production and food safety. *Vet. Res. Commun.* 27, 1, pp 471-479.
- Gloria Maris Groupe. (2020) <https://www.gloriamarisgroupe.com/aquanord/>. (Consulté le 24/08/2020)
- Goarant, C., Régnier, F., Brizard, R. et Marteau, A.-L. (1998) Acquisition of susceptibility to *Vibrio penaeicida* in *Penaeus stylirostris* postlarvae and juveniles. *Aquaculture* 169, 3-4, pp 291-296. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00380-9.
- Goarant, C., Ansquer, D., Herlin, J., Domalain, D., Imbert, F. et De Decker, S. (2006) "Summer syndrome" in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture* 253, 1-4, pp 105-113. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.07.031.
- Gomez-Gil, B., Thompson, F., Thompson, C. et Swings, J. (2003) *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1, pp 239-243. doi: 10.1099/ij.s.0.02430-0.
- Gomez-Gil, B., Soto-Rodríguez, S., García-Gasca, A., Roque, A., Vazquez-Juarez, R., Thompson, F. L. et Swings, J. (2004) Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology* 150, 6, pp 1769-1777. doi: 10.1099/mic.0.26797-0
- Gomez-Gil, B. et Roque, A. (2006) Isolation, enumeration, and preservation of the Vibrionaceae dans *The biology of vibrios*. (Thompson, F., Austin, B., & Swings, J., Ed.), pp 15-26, American Society of Microbiology. I.S.B.N.: 9781683671787.

- González-Lanza, C., Alvarez-Pellitero, P. et Sitjà-Bobadilla, A.** (1991) Diplectanidae (Monogenea) infestations of sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), from the Spanish Mediterranean area. *Parasitol. Res.* 77, 4, pp 307-314.
- Guglielmetti, E., Korhonen, J. M., Heikkinen, J., Morelli, L. et Von Wright, A.** (2009) Transfer of plasmid-mediated resistance to tetracycline in pathogenic bacteria from fish and aquaculture environments. *FEMS Microbiol. Lett.* 293, 1, pp 28-34. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01512.x.

H

- Hacker, J. et Kaper, J. B.** (1999) The concept of pathogenicity islands dans *Pathogenicity islands and other mobile virulence elements*. (Kaper, J., & Hacker, J., Ed.), pp 1-11, American Society of Microbiology. I.S.B.N.: 9781555818173.
- Haldar, S., Neogi, S., Kogure, K., Chatterjee, S., Chowdhury, N., Hinenoya, A., Asakura, M. et Yamasaki, S.** (2010a) Development of a haemolysin gene-based multiplex PCR for simultaneous detection of *Vibrio campbellii*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 50, 2, pp 146-152. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02769.x.
- Haldar, S., Maharajan, A., Chatterjee, S., Hunter, S., Chowdhury, N., Hinenoya, A., Asakura, M. et Yamasaki, S.** (2010b) Identification of *Vibrio harveyi* as a causative bacterium for a tail rot disease of sea bream *Sparus aurata* from research hatchery in Malta. *Microbiol. Res.* 165, 8, pp 639-648. doi: 10.1016/j.micres.2009.12.001.
- Haley, B. J., Choi, S. Y., Grim, C. J., Onifade, T. J., Cinar, H. N., Tall, B. D., Taviani, E., Hasan, N. A., Abdullah, A. H. et Carter, L.** (2014) Genomic and phenotypic characterization of *Vibrio cholerae* non-O1 isolates from a US Gulf Coast cholera outbreak. *PLoS One* 9, 4. doi: 10.1371/journal.pone.0086264.
- Hall, C. W. et Mah, T.-F.** (2017) Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 3, pp 276-301. doi: 10.1093/femsre/fux010.
- Hammer, B. K. et Bassler, B. L.** (2003) Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 50, 1, pp 101-104. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03688.x.
- Han, N., Mizan, M. F. R., Jahid, I. K. et Ha, S.-D.** (2016) Biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus* on food and food contact surfaces increases with rise in temperature. *Food Control* 70, pp 161-166. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.05.054.
- Handler, J., Carson, J., Donachie, L., Gabor, L. et Taylor, D.** (2005) Bacterial infection in Tasmanian farmed abalone: causes, pathology, farm factors and control options. Diseases in Asian aquaculture V. Proceedings of the 5th symposium on diseases in Asian aquaculture. 24-28 November 2002. Australia. pp. 289-300.
- Harris, L., Owens, L. et Smith, S.** (1996) A selective and differential medium for *Vibrio harveyi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 9, pp 3548-3550.
- Hasan, J., Huq, A., Tamplin, M. L., Siebeling, R. J. et Colwell, R. R.** (1994) A novel kit for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1, pp 249-252.

- Hastefnl, T., Guo'ding, R. et Eve-risen, B. (2005) Bacterial Vaccines for Fish - An Update of the current situation worldwide. *Dev Biol. Basel* 121, pp 55-74.
- Hazen, T. H., Martinez, R. J., Chen, Y., Lafon, P. C., Garrett, N. M., Parsons, M. B., Bopp, C. A., Sullards, M. C. et Sobecky, P. A. (2009) Rapid identification of *Vibrio parahaemolyticus* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 21, pp 6745-6756. doi: 10.1128/AEM.01171-09.
- Heidelberg, J., Heidelberg, K. et Colwell, R. (2002) Bacteria of the γ -subclass *Proteobacteria* associated with zooplankton in Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 11, pp 5498-5507. doi: 10.1128/AEM.68.11.5498-5507.2002.
- Heidelberg, J. F., Eisen, J. A., Nelson, W. C., Clayton, R. A., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D. et Umayam, L. (2000) DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406, 6795, p 477.
- Henke, J. M. et Bassler, B. L. (2004a) Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 186, 12, pp 3794-3805. doi: 10.1128/JB.186.12.3794-3805.2004.
- Henke, J. M. et Bassler, B. L. (2004b) Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* 186, 20, pp 6902-6914. doi: 10.1128/JB.186.20.6902-6914.2004.
- Hernandez, G. et Olmos, J. (2004) Molecular identification of pathogenic and nonpathogenic strains of *Vibrio harveyi* using PCR and RAPD. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 6, pp 722-727. doi: 10.1007/s00253-003-1451-z.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. et Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology* 11, 9, pp 1026-1030.
- Hispano, C., Nebra, Y. et Blanch, A. R. (1997) Isolation of *Vibrio harveyi* from an ocular lesion in the short sunfish (*Mola mola*). *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.*
- Hoffmann, M., Monday, S., Fischer, M. et Brown, E. (2012) Genetic and phylogenetic evidence for misidentification of *Vibrio* species within the Harveyi clade. *Lett. Appl. Microbiol.* 54, 2, pp 160-165. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03183.x.
- Hou, T.-Y., Chiang-Ni, C. et Teng, S.-H. (2019) Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *J. Food Drug Anal.* 27, 2, pp 404-414. doi: 10.1016/j.jfda.2019.01.001.
- Hrabák, J., Chudáčková, E. et Walková, R. (2013) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 1, pp 103-114. doi: 10.1128/CMR.00058-12.

I

- Igbinoso, E. O.** (2016) Detection and antimicrobial resistance of *Vibrio* isolates in aquaculture environments: implications for public health. *Microb. Drug Resist.* 22, 3, pp 238-245. doi: 10.1089/mdr.2015.0169.
- Ina-Salwany, M., Al-saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F. A., Mohd-Aris, A., Amal, M., Kasai, H., Mino, S., Sawabe, T. et Zamri-Saad, M.** (2019) Vibriosis in fish: a review on disease development and prevention. *J. Aquat. Anim. Health* 31, 1, pp 3-22. doi: 10.1002/aah.10045.
- ISO.** (2017) Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la détermination des *Vibrio* spp - Partie 1 : Recherche des espèces de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* et *Vibrio vulnificus* potentiellement entéropathogènes. NF EN ISO 21872-1 (Septembre 2017).
- Iwamoto, Y., Suzuki, Y., Kurita, A., Watanabe, Y., Shimizu, T., Ohgami, H. et Yanagihara, Y.** (1995) *Vibrio trachuri* sp. nov., a new species isolated from diseased Japanese horse mackerel. *Microbiol. Immunol.* 39, 11, pp 831-837.
- Izumiya, H., Matsumoto, K., Yahiro, S., Lee, J., Morita, M., Yamamoto, S., Arakawa, E. et Ohnishi, M.** (2011) Multiplex PCR assay for identification of three major pathogenic *Vibrio* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*. *Mol. Cell. Probes* 25, 4, pp 174-176. doi: 10.1016/j.mcp.2011.04.004.

J

- Janda, J. M. et Abbott, S. L.** (2007) 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45, 9, pp 2761-2764. doi: 10.1128/JCM.01228-07.
- Janssen, K., Chavanne, H., Berentsen, P. et Komen, H.** (2017) Impact of selective breeding on European aquaculture. *Aquaculture* 472, pp 8-16. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.03.012.
- Ji, Q., Wang, S., Ma, J. et Liu, Q.** (2020) A review: progress in the development of fish *Vibrio* spp. vaccines. *Immunol. Lett.* doi: 10.1016/j.imlet.2020.07.002.
- Jobling, M., Peruzzi, S. et Woods, C.** (2010) The temperate basses (Family: Moronidae) dans *Finfish aquaculture diversification*. (Jobling, M., & Carter, C., Ed.), pp 337-360, CABI Oxfordshire, UK. I.S.B.N.: 9781845934941.
- Johnson, C. N., Bowers, J. C., Griffitt, K. J., Molina, V., Clostio, R. W., Pei, S., Laws, E., Paranjpye, R. N., Strom, M. S. et Chen, A.** (2012) Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in the coastal and estuarine waters of Louisiana, Maryland, Mississippi, and Washington (United States). *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 20, pp 7249-7257. doi: 10.1128/AEM.01296-12.
- Johnson, F. H. et Shunk, I.** (1936) An interesting new species of luminous bacteria. *J. Bacteriol.* 31, 6, p 585.

Jouault, A., Gobet, A., Simon, M., Portier, E., Perennou, M., Corre, E., Gaillard, F., Vallenet, D., Michel, G., Fleury, Y., Bazire, A. et Dufour, A. (2020) Alterocin, an antibiofilm protein secreted by *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. *Appl. Environ. Microbiol.* doi: 10.1128/AEM.00893-20.

K

- Kahla-Nakbi, A. B., Chaieb, K., Besbes, A., Zmantar, T. et Bakhrouf, A. (2006) Virulence and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from Tunisian cultured gilthead sea bream and sea bass outbreaks. *Vet. Microbiol.* 117, 2-4, pp 321-327. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.06.012.
- Karaolis, D. K., Johnson, J. A., Bailey, C. C., Boedeker, E. C., Kaper, J. B. et Reeves, P. R. (1998) A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6, pp 3134-3139. doi: 10.1073/pnas.95.6.3134.
- Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G. et Karunasagar, I. (1994) Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 128, 3-4, pp 203-209. doi: 10.1016/0044-8486(94)90309-3.
- Karunasagar, I., Otta, S. et Karunasagar, I. (1996) Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces. *Aquaculture* 140, 3, pp 241-245. doi: 10.1016/0044-8486(95)01180-3.
- Kauffman, K. M., Hussain, F. A., Yang, J., Arevalo, P., Brown, J. M., Chang, W. K., VanInsberghe, D., Elsherbini, J., Sharma, R. S. et Cutler, M. B. (2018) A major lineage of non-tailed dsDNA viruses as unrecognized killers of marine bacteria. *Nature* 554, 7690, pp 118-122. doi: 10.1038/nature25474.
- Kazazić, S. P., Popović, N. T., Strunjak-Perović, I., Babić, S., Florio, D., Fioravanti, M., Bojanić, K. et Čož-Rakovac, R. (2019) Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry identification of *Vibrio (Listonella) anguillarum* isolated from sea bass and sea bream. *PloS one* 14, 11. doi: 10.1371/journal.pone.0225343.
- Khemayan, K., Prachumwat, A., Sonthayanon, B., Intaraprasong, A., Sriurairatana, S. et Flegel, T. W. (2012) Complete genome sequence of virulence-enhancing Siphophage VHS1 from *Vibrio harveyi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8, pp 2790-2796. doi: 10.1128/AEM.05929-11.
- Khouadja, S., Lamari, F. et Bakhrouf, A. (2013) Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during disease outbreaks. *Int. Aquat. Res.* 5, 1, p 13.
- Khouadja, S., Lamari, F., Bakhrouf, A. et Gaddour, K. (2014) Virulence properties, biofilm formation and random amplified polymorphic DNA analysis of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolates from cultured sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Microb. Pathog.* 69, pp 13-19. doi: 10.1016/j.micpath.2014.03.007.
- Kibbe, W. A. (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* 35, suppl_2, pp W43-W46. doi: 10.1093/nar/gkm234.

- Kim, J. Y. et Lee, J.-L. (2017) Correlation of Total Bacterial and *Vibrio spp.* Populations between Fish and Water in the Aquaculture System. *Front. Mar. Sci.* 4, p 147. doi: 10.3389/fmars.2017.00147.
- Kim, M., Oh, H.-S., Park, S.-C. et Chun, J. (2014a) Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 2, pp 346-351. doi: 10.1099/ij.s.0.059774-0.
- Kim, M. S., Cho, J. Y. et Choi, H. S. (2014b) Identification of *Vibrio harveyi*, *Vibrio ichthyenteri*, and *Photobacterium damsela* isolated from olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea by multiplex PCR developed using the *rpoB* gene. *Fish. Sci.* 80, 2, pp 333-339. doi: 10.1007/s12562-014-0702-5.
- Kim, S.-R., Nonaka, L., Oh, M.-J., Lavilla-Pitogo, C. R. et Suzuki, S. (2003) Distribution of an oxytetracycline resistance determinant tet (34) among marine bacterial isolates of a *Vibrio* species. *Microbes Environ.* 18, 2, pp 74-81. doi: 10.1264/jsme2.18.74.
- Kim, S. G., Jun, J. W., Giri, S. S., Yun, S., Kim, H. J., Kim, S. W., Kang, J. W., Han, S. J., Jeong, D. et Park, S. C. (2019) Isolation and characterisation of pVa-21, a giant bacteriophage with anti-biofilm potential against *Vibrio alginolyticus*. *Sci. Rep.* 9, 1, pp 1-10. doi: 10.1038/s41598-019-42681-1.
- King, W. L., Jenkins, C., Go, J., Siboni, N., Seymour, J. R. et Labbate, M. (2019) Characterisation of the Pacific oyster microbiome during a summer mortality event. *Microb. Ecol.* 77, 2, pp 502-512. doi: 10.1007/s00248-018-1226-9.
- Knibb, W., Colorni, A., Ankaoua, M., Lindell, D., Diamant, A. et Gordin, H. (1993) Detection and identification of a pathogenic marine *Mycobacterium* from the European seabass *Dicentrarchus labrax* using polymerase chain reaction and direct sequencing of 16S rDNA sequences. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 2, 4, pp 225-232.
- Kobayashi, T., Enomoto, S., Sakazaki, R. et Kuwahara, S. (1963) A new selective isolation medium for the *Vibrio* group; on a modified Nakanishi's medium (TCBS agar medium). *Nihon saikingaku zasshi. Japanese journal of bacteriology.* 18, pp 387-392.
- Kong, N.-N., Fang, S.-T., Liu, Y., Wang, J.-H., Yang, C.-Y. et Xia, C.-H. (2014) Flavonoids from the halophyte *Apocynum venetum* and their antifouling activities against marine biofilm-derived bacteria. *Nat. Prod. Res.* 28, 12, pp 928-931. doi: 10.1080/14786419.2014.886205.
- Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P. et Hall-Stoodley, L. (2017) Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 12, p 740. doi: 10.1038/nrmicro.2017.99.
- Kopprio, G. A., Streitenberger, M. E., Okuno, K., Baldini, M., Biancalana, F., Fricke, A., Martínez, A., Neogi, S. B., Koch, B. P. et Yamasaki, S. (2017) Biogeochemical and hydrological drivers of the dynamics of *Vibrio* species in two Patagonian estuaries. *Sci. Total Environ.* 579, pp 646-656. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.11.045.
- Korun, J. et Timur, G. (2008) Marine vibrios associated with diseased sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *J. FisheriesSciences.com* 2, 1, pp 66-76. doi: 10.3153/jfsc.com.2008007.

- Kousoulaki, K., Sæther, B. S., Albrektsen, S. et Noble, C. (2015) Review on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758) nutrition and feed management: a practical guide for optimizing feed formulation and farming protocols. *Aquacult. Nutr.* 21, 2, pp 129-151. doi: 10.1111/anu.12233.
- Kraxberger-Beatty, T., McGarey, D., Grier, H. et Lim, D. (1990) *Vibrio harveyi*, an opportunistic pathogen of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch), held in captivity. *J. Fish Dis.* 13, 6, pp 557-560.
- Ky, C.-L., Vergnet, A., Molinari, N., Fauvel, C. et Bonhomme, F. (2012) Fitness of early life stages in F1 interspecific hybrids between *Dicentrarchus labrax* and *D. punctatus*. *Aquat. Living Resour.* 25, 1, pp 67-75. doi: 10.1051/alr/2012006.

L

- La Scola, B. et Raoult, D. (2009) Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS one* 4, 11, p e8041. doi: 10.1371/journal.pone.0008041.
- Labrie, S. J., Samson, J. E. et Moineau, S. (2010) Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 5, pp 317-327. doi: 10.1038/nrmicro2315.
- Le Breton, A. (1999) Mediterranean finfish pathologies: present status and new developments in prophylactic methods. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 19, 6, pp 250-253.
- Le Norcy, T., Niemann, H., Proksch, P., Linossier, I., Vallée-Réhel, K., Hellio, C. et Faÿ, F. (2017a) Anti-biofilm effect of biodegradable coatings based on hemibastadin derivative in marine environment. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 7, p 1520. doi: 10.3390/ijms18071520.
- Le Norcy, T., Niemann, H., Proksch, P., Tait, K., Linossier, I., Réhel, K., Hellio, C. et Faÿ, F. (2017b) Sponge-inspired dibromohemibastadin prevents and disrupts bacterial biofilms without toxicity. *Mar. Drugs* 15, 7, p 222. doi: 10.3390/md15070222.
- Lee, K.-K., Chen, Y.-L. et Liu, P.-C. (1999) Hemostasis of tiger prawn *Penaeus monodon* affected by *Vibrio harveyi*, extracellular products, and a toxic cysteine protease. *Blood Cells, Mol., Dis.* 25, 4, pp 180-192. doi: 10.1006/bcmd.1999.0244.
- Lee, K., Liu, P. et Chuang, W. (2002) Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish. *Mar. Biotechnol.* 4, 3, pp 267-277.
- Li, Y., Chen, J., Zhao, M., Yang, Z., Yue, L. et Zhang, X. (2017) Promoting resuscitation of viable but nonculturable cells of *Vibrio harveyi* by a resuscitation-promoting factor-like protein YeaZ. *J. Appl. Microbiol.* 122, 2, pp 338-346. doi: 10.1111/jam.13342.
- Lilley, B. N. et Bassler, B. L. (2000) Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and sigma-54. *Mol. Microbiol.* 36, 4, pp 940-954. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01913.x.
- Lin, Z., Kumagai, K., Baba, K., Mekalanos, J. et Nishibuchi, M. (1993) *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae toxRS* operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene. *J. Bacteriol.* 175, 12, pp 3844-3855. doi: 10.1128/jb.175.12.3844-3855.1993.

- Liu, C.-H., Cheng, W., Hsu, J.-P. et Chen, J.-C. (2004a) *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. *Dis. Aquat. Org.* 61, 1-2, pp 169-174. doi: 10.3354/dao061169.
- Liu, P.-C., Lee, K.-K., Yii, K.-C., Kou, G.-H. et Chen, S.-N. (1996a) News & notes: Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*. *Curr. Microbiol.* 33, 2, pp 129-132.
- Liu, P.-C., Lee, K.-K., Tu, C.-C. et Chen, S.-N. (1997) Purification and characterization of a cysteine protease produced by pathogenic luminous *Vibrio harveyi*. *Curr. Microbiol.* 35, 1, pp 32-39.
- Liu, P.-C., Lin, J.-Y., Chuang, W.-H. et Lee, K.-K. (2004b) Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) from the farmed marine cobia fish *Rachycentron canadum* L. with gastroenteritis syndrome. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 5, pp 495-499.
- Liu, P. C., Lee, K. K. et Chen, S. N. (1996b) Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Lett. Appl. Microbiol.* 22, 6, pp 413-416. doi: 10.1111/j.1472-765X.1996.tb01192.x.
- Liu, P. C., Chuang, W. H. et Lee, K. K. (2003) Infectious gastroenteritis caused by *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) in cultured red drum, *Sciaenops ocellatus*. *J. Appl. Ichthyol.* 19, 1, pp 59-61. doi: 10.1046/j.1439-0426.2003.00356.x.
- Liu, Y., Suo, X., Wang, Z., Gong, Y., Wang, X. et Li, H. (2017) Developing polyimide-copper antifouling coatings with capsule structures for sustainable release of copper. *Mater. Des.* 130, pp 285-293. doi: 10.1016/j.matdes.2017.05.075.
- López, J. R., de la Roca, E., Núñez, S., de la Herran, R., Navas, J. I., Manchado, M., Herrera, M. et Toranzo, A. E. (2009) Identification of *Vibrio harveyi* isolated from diseased cultured wedge sole *Dicologlossa cuneata*. *Dis. Aquat. Org.* 84, 3, pp 209-217. doi: 10.3354/dao02045.
- LPSN. (2020) List of prokaryotic names with standing in nomenclature <https://www.bacterio.net/>. (Consulté le 20/09/2020)
- Lu, L., Hu, W., Tian, Z., Yuan, D., Yi, G., Zhou, Y., Cheng, Q., Zhu, J. et Li, M. (2019) Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chin. Med-UK* 14, 1, p 11. doi: 10.1186/s13020-019-0232-2.
- Lucas, J. S., Southgate, P. C. et Tucker, C. S. (2019) *Aquaculture: farming aquatic animals and plants*, John Wiley & Sons. I.S.B.N.: 9781119230861.
- Lulijwa, R., Rupia, E. J. et Alfaro, A. C. (2020) Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. *Rev. Aquacult.* 12, 2, pp 640-663. doi: 10.1111/raq.12344.
- Lv, J., Mao, J. et Ba, H. (2015) Influence of marine microorganisms on the permeability and microstructure of mortar. *Constr. Build. Mater.* 77, pp 33-40. doi: 10.1016/j.conbuildmat.2014.11.072.

M

- Magariños, B., Toranzo, A. E. et Romalde, J. L. (1996) Phenotypic and pathobiological characteristics of *Pasteurella piscicida*. *Annu. Rev. Fish Dis.* 6, pp 41-64.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M. et Yamashita, A. (2003) Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V cholerae*. *Lancet* 361, 9359, pp 743-749. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12659-1.
- Manefield, M., Harris, L., Rice, S. A., de Nys, R. et Kjelleberg, S. (2000) Inhibition of luminescence and virulence in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) pathogen *Vibrio harveyi* by intercellular signal antagonists. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5, pp 2079-2084. doi: 10.1128/AEM.66.5.2079-2084.2000.
- Martinez-Urtaza, J., Lozano-Leon, A., Varela-Pet, J., Trinanes, J., Pazos, Y. et Garcia-Martin, O. (2008) Environmental determinants of the occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the rias of Galicia, Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1, pp 265-274. doi: 10.1128/AEM.01307-07.
- Martins, P., Coelho, F. J., Cleary, D. F., Pires, A. C., Marques, B., Rodrigues, A. M., Quintino, V. et Gomes, N. C. (2018) Seasonal patterns of bacterioplankton composition in a semi-intensive European seabass (*Dicentrarchus labrax*) aquaculture system. *Aquaculture* 490, pp 240-250. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.02.038.
- Maulvault, A. L., Barbosa, V., Alves, R., Anacleto, P., Camacho, C., Cunha, S., Fernandes, J. O., Ferreira, P. P., Rosa, R. et Marques, A. (2018) Integrated multi-biomarker responses of juvenile seabass to diclofenac, warming and acidification co-exposure. *Aquat. Toxicol.* 202, pp 65-79. doi: 10.1016/j.aquatox.2018.06.016.
- Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V. A. et Davies, J. (1998) A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science* 280, 5363, pp 605-608.
- McCarter, L. L. (2001) Polar flagellar motility of the Vibrionaceae. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 3, pp 445-462.
- McInnes, R. S., McCallum, G. E., Lamberte, L. E. et van Schaik, W. (2020) Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome. *Curr. Opin. Microbiol.* 53, pp 35-43. doi: 10.1016/j.mib.2020.02.002.
- McRose, D. L., Baars, O., Seyedsayamdost, M. R. et Morel, F. M. (2018) Quorum sensing and iron regulate a two-for-one siderophore gene cluster in *Vibrio harveyi*. *P. Natl. Acad. Sci.* 115, 29, pp 7581-7586. doi: 10.1073/pnas.1805791115.
- Millar, B. C., Xu, J. et Moore, J. E. (2007) Molecular Diagnostics of Medically Important Bacterial Infections. *Curr. Issues Mol. Biol.* 9, 1, p 21.
- Miller, S. D., Haddock, S. H., Elvidge, C. D. et Lee, T. F. (2005) Detection of a bioluminescent milky sea from space. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 40, pp 14181-14184. doi: 10.1073/pnas.0507253102.
- Minami, T., Iwata, K., Shimahara, Y. et Yuasa, K. (2016) *Vibrio harveyi* infection in farmed greater amberjack *Seriola dumerili*. *Fish Pathol.*

- Mohi, M., Kuratani, M., Miyazaki, T. et Yoshida, T. (2010) Histopathological studies on *Vibrio harveyi*-infected tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Temminck et Schlegel), cultured in Japan. *J. Fish Dis.* **33**, 10, pp 833-840. doi: 10.1111/j.1365-2761.2010.01184.x.
- Mok, K. C., Wingreen, N. S. et Bassler, B. L. (2003) *Vibrio harveyi* quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression. *The EMBO journal* **22**, 4, pp 870-881. doi: 10.1093/emboj/cdg085.
- Montánchez, I., Ogayar, E., Plágaro, A. H., Esteve-Codina, A., Gómez-Garrido, J., Orruño, M., Arana, I. et Kaberdin, V. R. (2019) Analysis of *Vibrio harveyi* adaptation in sea water microcosms at elevated temperature provides insights into the putative mechanisms of its persistence and spread in the time of global warming. *Sci. Rep.* **9**, 1, p 289. doi: 10.1038/s41598-018-36483-0.
- Montánchez, I. et Kaberdin, V. R. (2019) *Vibrio harveyi*: A brief survey of general characteristics and recent epidemiological traits associated with climate change. *Mar. Environ. Res.*, p 104850. doi: 10.1016/j.marenvres.2019.104850.
- Montero, A. et Austin, B. (1999) Characterization of extracellular products from an isolate of *Vibrio harveyi* recovered from diseased post-larval *Penaeus vannamei* (Bonne). *J. Fish Dis.* **22**, 5, pp 377-386. doi: 10.1046/j.1365-2761.1999.00189.x.
- Montgomery, M. T. et Kirchman, D. L. (1994) Induction of chitin-binding proteins during the specific attachment of the marine bacterium *Vibrio harveyi* to chitin. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 12, pp 4284-4288.
- Mougin, J., Copin, S., Bojolly, D., Ragueneau, V., Robert-Pillot, A., Quilici, M.-L., Midelet-Bourdin, G., Grard, T. et Bonnin-Jusserand, M. (2019) Adhesion to stainless steel surfaces and detection of viable but non cultivable cells of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* isolated from shrimps in seafood processing environments: Stayin'alive? *Food Control* **102**, pp 122-130. doi: 10.1016/j.foodcont.2019.03.024.
- Mougin, J., Roquigny, R., Travers, M.-A., Grard, T., Bonnin-Jusserand, M. et Le Bris, C. (2020a) Development of a *mreB*-targeted real-time PCR method for the quantitative detection of *Vibrio harveyi* in seawater and biofilm from aquaculture systems. *Aquaculture*, p 735337. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735337.
- Mougin, J., Flahaut, C., Roquigny, R., Bonnin-Jusserand, M., Grard, T. et Le Bris, C. (2020b) Rapid identification of *Vibrio* species of the the Harveyi clade using MALDI-TOF MS profiling with main spectral profile database implemented with an in-house database: Luvibase. *Front. Microbiol.* **11**, p 2494. doi: 10.3389/fmicb.2020.586536.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. et Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Munari, C. et Mistri, M. (2007) Effect of copper on the scope for growth of clams (*Tapes philippinarum*) from a farming area in the Northern Adriatic Sea. *Mar. Environ. Res.* **64**, 3, pp 347-357. doi: 10.1016/j.marenvres.2007.02.006.
- Muniesa, A., Basurco, B., Aguilera, C., Furones, D., Reverté, C., Sanjuan-Vilaplana, A., Jansen, M. D., Brun, E. et Tavoranpanich, S. (2020) Mapping the knowledge

of the main diseases affecting sea bass and sea bream in Mediterranean. *Transboundary Emerging Dis.* doi: 10.1111/tbed.13482.

Munro, J., Oakey, J., Bromage, E. et Owens, L. (2003) Experimental bacteriophage-mediated virulence in strains of *Vibrio harveyi*. *Dis. Aquat. Org.* 54, 3, pp 187-194. doi: 10.3354/dao054187.

N

Naciri, M., Lemaire, C., Borsa, P. et Bonhomme, F. (1999) Genetic study of the Atlantic/Mediterranean transition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Hered.* 90, 6, pp 591-596. doi: 10.1093/jhered/90.6.591.

Nair, G. B., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S. K., Dutta, B., Takeda, Y. et Sack, D. A. (2007) Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3: K6 and its serovariants. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 1, pp 39-48.

Natrah, F., Ruwandeepika, H. D., Pawar, S., Karunasagar, I., Sorgeloos, P., Bossier, P. et Defoirdt, T. (2011) Regulation of virulence factors by quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Vet. Microbiol.* 154, 1-2, pp 124-129. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.06.024.

Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A. et Austin, B. (2014) Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture* 431, pp 1-11. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.08.026.

Nicholls, K., Lee, J. et Donovan, T. (1976) An evaluation of commercial thiosulphate citrate bile salt sucrose agar (TCBS). *J. Appl. Bacteriol.* 41, 2, pp 265-269. doi: 10.1111/j.1365-2672.1976.tb00629.x.

Nicolas, J., Basuyaux, O., Mazurie, J. et Thebault, A. (2002) *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Dis. Aquat. Org.* 50, 1, pp 35-43. doi: 10.3354/dao050035.

Nir, S. et Reches, M. (2016) Bio-inspired antifouling approaches: the quest towards non-toxic and non-biocidal materials. *Curr. Opin. Biotechnol.* 39, pp 48-55. doi: 10.1016/j.copbio.2015.12.012.

Nishimori, E., Hasegawa, O., Numata, T. et Wakabayashi, H. (1998) *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor supratexta*. *Fish Pathol.* 33, 5, pp 495-502. doi: 10.3147/jsfp.33.495.

Nocker, A., Cheung, C.-Y. et Camper, A. K. (2006) Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J. Microbiol. Methods* 67, 2, pp 310-320. doi: 10.1016/j.mimet.2006.04.015.

Novriadi, R. (2016) Vibriosis in aquaculture. *Omni-Akuatika* 12, 1, pp 1-12. doi: 10.20884/1.oa.2016.12.1.24.

Nowakowska, J. et Oliver, J. D. (2013) Resistance to environmental stresses by *Vibrio vulnificus* in the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiol. Ecol.* 84, 1, pp 213-222. doi: 10.1111/1574-6941.12052.

Nuttall, I., Miyagishima, K., Roth, C. et de La Rocque, S. (2014) The United Nations and One Health: the International Health Regulations (2005) and global health security. *Rev. Sci. Tech.* 33, 2, pp 659-68. doi: 10.20506/RST.33.2.2303.

O

O'Toole, G. A. (2011) Microtiter dish biofilm formation assay. *JoVE*, 47, p e2437. doi: 10.3791/2437.

O'Toole, R., Von Hofsten, J., Rosqvist, R., Olsson, P.-E. et Wolf-Watz, H. (2004) Visualisation of zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum*. *Microb. Pathog.* 37, 1, pp 41-46. doi: 10.1016/j.micpath.2004.03.001.

O'Neill, J. (2016) Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *Review on Antimicrobial Resistance*.

Oakey, H. et Owens, L. (2000) A new bacteriophage, VHML, isolated from a toxin-producing strain of *Vibrio harveyi* in tropical Australia. *J. Appl. Microbiol.* 89, 4, pp 702-709. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.01169.x.

Oakey, H., Levy, N., Bourne, D., Cullen, B. et Thomas, A. (2003) The use of PCR to aid in the rapid identification of *Vibrio harveyi* isolates. *J. Appl. Microbiol.* 95, 6, pp 1293-1303. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02128.x.

Oberbeckmann, S., Fuchs, B. M., Meiners, M., Wichels, A., Wiltshire, K. H. et Gerdt, G. (2012) Seasonal dynamics and modeling of a *Vibrio* community in coastal waters of the North Sea. *Microb. Ecol.* 63, 3, pp 543-551. doi: 10.1007/s00248-011-9990-9.

Oh, M.-J., Kim, W.-S., Kitamura, S.-I., Lee, H.-k., Son, B. W., Jung, T.-S. et Jung, S.-J. (2006) Change of pathogenicity in Olive flounder *Paralichthys olivaceus* by co-infection of *Vibrio harveyi*, *Edwardsiella tarda* and marine birnavirus. *Aquaculture* 257, 1-4, pp 156-160. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.03.009.

Okada, K., Iida, T., Kita-Tsukamoto, K. et Honda, T. (2005) Vibrios commonly possess two chromosomes. *J. Bacteriol.* 187, 2, pp 752-757. doi: 10.1128/JB.187.2.752-757.2005.

Oliveira, J., Castilho, F., Cunha, A. et Pereira, M. (2012) Bacteriophage therapy as a bacterial control strategy in aquaculture. *Aquacult. Int.* 20, 5, pp 879-910. doi: 10.1007/s10499-012-9515-7.

Oliver, J. D. (2005) *Vibrio vulnificus* dans *Oceans and health: pathogens in the marine environment*. (Belkin, S., & Colwell, R. R., Ed.), pp 253-276, Springer. I.S.B.N.: 978-0-387-23709-1.

Oliver, J. D. (2010) Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 4, pp 415-425. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x.

Orruño, M., Kaberdin, V. et Arana, I. (2017) Survival strategies of *Escherichia coli* and *Vibrio* spp.: contribution of the viable but nonculturable phenotype to their stress-resistance and persistence in adverse environments. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33, 3, p 45. doi: 10.1007/s11274-017-2218-5.

Owens, L., Austin, D. A. et Austin, B. (1996) Effect of strain origin on siderophore production in *Vibrio harveyi* isolates. *Dis. Aquat. Org.* 27, 2, pp 157-160. doi: 10.3354/dao027157.

P

Paauw, A., Trip, H., Niemcewicz, M., Sellek, R., Heng, J. M., Mars-Groenendijk, R. H., De Jong, A. L., Majchrzykiewicz-Koehorst, J. A., Olsen, J. S. et Tsvitshivadze, E. (2014) OmpU as a biomarker for rapid discrimination between toxigenic and epidemic *Vibrio cholerae* O1/O139 and non-epidemic *Vibrio cholerae* in a modified MALDI-TOF MS assay. *BMC Microbiol.* 14, 1, p 158. doi: 1471-2180/14/158.

Pacini, F. (1854) Osservazioni microscopiche e deduzioni patologiche sul cholera asiatico. *Gaz. Med. Ital. Toscana Firenze.* , 6, pp 405–412.

Paillard, C., Allam, B. et Oubella, R. (2004) Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Org.* 59, 3, pp 249-262. doi: 10.3354/dao059249.

Paillard, C., Korsnes, K., Le Chevalier, P., Le Boulay, C., Harkestad, L., Eriksen, A. G., Willassen, E., Bergh, Ø., Bovo, C. et Skår, C. (2008) *Vibrio tapetis*-like strain isolated from introduced Manila clams *Ruditapes philippinarum* showing symptoms of brown ring disease in Norway. *Dis. Aquat. Org.* 81, 2, pp 153-161. doi: 10.3354/dao01950.

Pakingking Jr, R., Bautista, N. B., Catedral, D. et de Jesus-Ayson, E. G. (2018) Characterisation of *Vibrio* isolates recovered from the eyes of cage-cultured pompano (*Trachinotus blochii*) infested with caligid parasites (*Lepeophtheirus spinifer*). *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.* 38, 1, pp 35-41.

Pang, L., Zhang, X. H., Zhong, Y., Chen, J., Li, Y. et Austin, B. (2006) Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the toxR gene. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 3, pp 249-255. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01962.x.

Papenfort, K. et Bassler, B. L. (2016) Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 9, p 576. doi: 10.1038/nrmicro.2016.89.

Parada, A. E., Needham, D. M. et Fuhrman, J. A. (2016) Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ. Microbiol.* 18, 5, pp 1403-1414. doi: 10.1111/1462-2920.13023.

Pascual, J., Macián, M. C., Arahal, D. R., Garay, E. et Pujalte, M. J. (2010) Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1, pp 154-165. doi: 10.1099/ijs.0.010702-0

Pass, D., Dybdahl, R. et Mannion, M. (1987) Investigations into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in western Australia. *Aquaculture* 65, 2, pp 149-169. doi: 10.1016/0044-8486(87)90259-6.

- Pavia, A. T., Bryan, J. A., Maher, K. L., Hester Jr, T. R. et Farmer III, J. (1989) *Vibrio carchariae* infection after a shark bite. *Ann. Intern. Med.* 111, 1, pp 85-86. doi: 10.7326/0003-4819-111-1-85.
- Pedersen, K., Verdonck, L., Austin, B., Austin, D. A., Blanch, A. R., Grimont, P. A., Jofre, J., Koblavi, S., Larsen, J. L. et Tiainen, T. (1998) Taxonomic evidence that *Vibrio carchariae* Grimes et al. 1985 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann et al. 1981. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 48, 3, pp 749-758. doi: 10.1099/00207713-48-3-749.
- Peerailil, S., Joseph, T. C., Murugadas, V., Akhlnath, P., Sreejith, V. et Lalitha, K. (2020) *Vibrio harveyi* virulence gene expression in vitro and in vivo during infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 139, pp 153-160. doi: 10.3354/dao03475.
- Pereira, C., Salvador, S., Arrojado, C., Silva, Y., Santos, A. L., Cunha, Â., Gomes, N. et Almeida, A. (2011) Evaluating seasonal dynamics of bacterial communities in marine fish aquaculture: a preliminary study before applying phage therapy. *J. Environ. Monit.* 13, 4, pp 1053-1058. doi: 10.1039/c0em00434k.
- Pérez-Ruzafa, A. et Marcos, C. (2014) Ecology and distribution of *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus 1758) dans *Biology of European sea bass*. (Vázquez, F., & Muñoz-Cueto, J., Ed.). I.S.B.N.: 1466599456.
- Pérez-Sánchez, T., Mora-Sánchez, B. et Balcázar, J. L. (2018) Biological approaches for disease control in aquaculture: advantages, limitations and challenges. *Trends Microbiol.*
- Pérez-Sancho, M., Ana, I. V., Awad, M., Kostrzewa, M., Domínguez, L. et Fernández-Garayzábal, J. F. (2016) Differentiation of *Photobacterium damsela* subspecies using matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in fish isolates. *Aquaculture* 464, pp 159-164. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.06.024.
- Piferrer, F., Blázquez, M., Navarro, L. et González, A. (2005) Genetic, endocrine, and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 1-2, pp 102-110. doi: 10.1016/j.ygcen.2005.02.011.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D. et Team, R. C. (2018) nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-137. Vienna, Austria: R Foundation.
- Pizzutto, M. et Hirst, R. G. (1995) Classification of isolates of *Vibrio harveyi* virulent to *Penaeus monodon* larvae by protein profile analysis and M13 DNA fingerprinting. *Dis. Aquat. Org.* 21, 1, pp 61-68. doi: 10.3354/dao021061.
- Prasad, S., Morris, P. C., Hansen, R., Meaden, P. G. et Austin, B. (2005) A novel bacteriocin-like substance (BLIS) from a pathogenic strain of *Vibrio harveyi*. *Microbiology* 151, 9, pp 3051-3058. doi: 10.1099/mic.0.28011-0.
- Prayitno, S. B. et Latchford, J. (1995) Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. *Aquaculture* 132, 1-2, pp 105-112. doi: 10.1016/0044-8486(94)00374-W.

- Preto, T.** (2018) Vibriosis da *Vibrio harveyi*: studi di eziopatogenesi e di efficacia vaccinale nel branzino (*Dicentrarchus labrax*). Scienze Veterinarie. Thèse de l'université Alma Mater Studiorum – Università di Bologna.
- Proft, T. et Baker, E.** (2009) Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria-structure, assembly and their role in disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 4, p 613. doi: 10.1007/s00018-008-8477-4.
- Prouty, M. G. et Klose, K. E.** (2006) *Vibrio cholerae*: the genetics of pathogenesis and environmental persistence dans *The biology of vibrios*. (Thompson, F., Austin, B., & Swings, J., Ed.), pp 311-339, American Society of Microbiology. I.S.B.N.: 9781683671787.
- Pujalte, M., Sitjà-Bobadilla, A., Macián, M., Belloch, C., Alvarez-Pellitero, P., Pérez-Sánchez, J., Uruburu, F. et Garay, E.** (2003) Virulence and molecular typing of *Vibrio harveyi* strains isolated from cultured dentex, gilthead sea bream and European sea bass. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**, 2, pp 284-292. doi: 10.1078/072320203322346146.
- Pujalte, M. J., Ortigosa, M., Macián, M. C. et Garay, E.** (1999) Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater. *Int. Microbiol.* **2**, 4, pp 259-266.

Q

- Quéro, J. et Vayne, J.** (1997) *Les Poissons de Mer des Pêches françaises*. Ifremer/Delachaux et Niestlé.
- Quince, C., Lanzen, A., Davenport, R. J. et Turnbaugh, P. J.** (2011) Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC Bioinf.* **12**, 1, p 38. doi: 10.1186/1471-2105-12-38.

R

- R Core Team.** (2013) R: A language and environment for statistical computing.
- Rahmani, A., Vercauteren, M., Vranckx, K., Boyen, F., Bidault, A., Pichereau, V., Decostere, A., Paillard, C. et Chiers, K.** (2020) MALDI-TOF MS as a promising tool to assess potential virulence of *Vibrio tapetis* isolates. *Aquaculture*, p 735729. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735729.
- Ramamurthy, T.** (1993) Emergence of novel strain of *Vibrio cholerae* with epidemic potential in southern and eastern India. *Lancet* **341**, pp 703-704. doi: 10.1016/0140-6736(93)90480-5.
- Rameshkumar, P., Nazar, A., Pradeep, M., Kalidas, C., Jayakumar, R., Tamilmani, G., Sakthivel, M., Samal, A. K., Sirajudeen, S. et Venkatesan, V.** (2017) Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from sea cage cultured cobia (*Rachycentron canadum* (Linnaeus 1766)) in India. *Lett. Appl. Microbiol.* **65**, 5, pp 423-430. doi: 10.1111/lam.12800.

- Ransom, D., Lannan, C., Rohovec, J. et Fryer, J. (1984) Comparison of histopathology caused by *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* in three species of Pacific salmon. *J. Fish Dis.* 7, 2, pp 107-115. doi: 10.1111/j.1365-2761.1984.tb00913.x.
- Rebouças, R. H., de Sousa, O. V., Lima, A. S., Vasconcelos, F. R., de Carvalho, P. B. et dos Fernandes Vieira, R. H. S. (2011) Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil. *Environ. Res.* 111, 1, pp 21-24. doi: 10.1016/j.envres.2010.09.012.
- Reverter, M., Sarter, S., Caruso, D., Avarre, J.-C., Combe, M., Pepey, E., Pouyaud, L., Vega-Heredía, S., De Verdal, H. et Gozlan, R. E. (2020) Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance. *Nat. Commun.* 11, 1, pp 1-8. doi: 10.1038/s41467-020-15735-6.
- Riley, M. A. et Wertz, J. E. (2002) Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 1, pp 117-137. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.161024.
- Rivas, A. J., Lemos, M. L. et Osorio, C. R. (2013) *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a bacterium pathogenic for marine animals and humans. *Front. Microbiol.* 4, p 283. doi: 10.3389/fmicb.2013.00283.
- Robertson, P., Xu, H.-S. et Austin, B. (1998) An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Vibrio harveyi* in penaeid shrimp and water. *J. Microbiol. Methods* 34, 1, pp 31-39. doi: 10.1016/S0167-7012(98)00066-9.
- Rodrigues, S., Paillard, C., Dufour, A. et Bazire, A. (2015) Antibiofilm activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 against *Vibrio tapetis*, the causative agent of brown ring disease. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 7, 1, pp 45-51. doi: 10.1007/s12602-014-9173-3.
- Roquigny, R., Mougin, J., Le Bris, C., Bonnin-Jusserand, M., Doyen, P. et Grand, T. (2021) Characterization of the marine aquaculture microbiome: A seasonal survey in a seabass farm. *Aquaculture*, p 735987. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735987.
- Rowe-Magnus, D. A., Zouine, M. et Mazel, D. (2006) The adaptive genetic arsenal of pathogenic *Vibrio* species: the role of integrons dans *The biology of vibrios*. (Thompson, F., Austin, B., & Swings, J., Ed.), pp 95-111, American Society of Microbiology. I.S.B.N.: 9781683671787.
- Rowe-Magnus, D. A., Guerout, A. M. et Mazel, D. (2002) Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. *Mol. Microbiol.* 43, 6, pp 1657-1669. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02861.x.
- Rozen, S. et Skaletsky, H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics methods and protocols: Methods in Molecular Biology*, pp 365-386. doi: 10.1385/1-59259-192-2:365.
- Ruangpan, L. (1998) Luminous bacteria associated with shrimp mortality. *Advances in shrimp biotechnology*, pp 205-211.
- Rutherford, S. T. et Bassler, B. L. (2012) Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *CSH Perspect. Med.* 2, 11, p a012427. doi: 10.1101/cshperspect.a012427.

- Ruwandeeepika, H., Defoirdt, T., Bhowmick, P., Shekar, M., Bossier, P. et Karunasagar, I. (2010) Presence of typical and atypical virulence genes in vibrio isolates belonging to the Harveyi clade. *J. Appl. Microbiol.* 109, 3, pp 888-899. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04715.x.
- Ruwandeeepika, H. D., Defoirdt, T., Bhowmick, P. P., Karunasagar, I., Karunasagar, I. et Bossier, P. (2011) In vitro and in vivo expression of virulence genes in *Vibrio* isolates belonging to the Harveyi clade in relation to their virulence towards gnotobiotic brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Environ. Microbiol.* 13, 2, pp 506-517. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02354.x.

S

- Saeed, M. (1995) Association of *Vibrio harveyi* with mortalities in cultured marine fish in Kuwait. *Aquaculture* 136, 1-2, pp 21-29. doi: 10.1016/0044-8486(95)01045-9.
- Sandrin, T. R., Goldstein, J. E. et Schumaker, S. (2013) MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrom. Rev.* 32, 3, pp 188-217. doi: 10.1002/mas.21359.
- Santos, I. C., Hildenbrand, Z. L. et Schug, K. A. (2016) Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. *Analyst* 141, 10, pp 2827-2837. doi: 10.1039/C6AN00131A.
- Satish, L., Santhakumari, S., Gowrishankar, S., Pandian, S. K., Ravi, A. V. et Ramesh, M. (2017) Rapid biosynthesized AgNPs from *Gelidiella acerosa* aqueous extract mitigates quorum sensing mediated biofilm formation of *Vibrio* species - an *in vitro* and *in vivo* approach. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, pp 1-15. doi: 10.1007/s11356-017-0296-4.
- Sauget, M., Valot, B., Bertrand, X. et Hocquet, D. (2017) Can MALDI-TOF mass spectrometry reasonably type bacteria? *Trends Microbiol.* 25, 6, pp 447-455. doi: 10.1016/j.tim.2016.12.006.
- Saulnier, D., De Decker, S. et Haffner, P. (2009) Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: a useful tool for epidemiologic studies. *J. Microbiol. Methods* 77, 2, pp 191-197. doi: 10.1016/j.mimet.2009.01.021.
- Sawabe, T., Setoguchi, N., Inoue, S., Tanaka, R., Ootsubo, M., Yoshimizu, M. et Ezura, Y. (2003) Acetic acid production of *Vibrio haliotocoli* from alginate: a possible role for establishment of abalone-*V. haliotocoli* association. *Aquaculture* 219, 1-4, pp 671-679. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00618-X.
- Sawabe, T., Kita-Tsukamoto, K. et Thompson, F. L. (2007a) Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis. *J. Bacteriol.* 189, 21, pp 7932-7936. doi: 10.1128/JB.00693-07.
- Sawabe, T., Inoue, S., Fukui, Y., Yoshie, K., Nishihara, Y. et Miura, H. (2007b) Mass mortality of Japanese abalone *Haliotis discus hannai* caused by *Vibrio harveyi* infection. *Microbes Environ.* 22, 3, pp 300-308. doi: 10.1264/jsme2.22.300.

- Sawabe, T., Ogura, Y., Matsumura, Y., Gao, F., Amin, A., Mino, S., Nakagawa, S., Sawabe, T., Kumar, R. et Fukui, Y. (2013) Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Front. Microbiol.* 4, p 414. doi: 10.3389/fmicb.2013.00414
- Schaeck, M., Duchateau, L., Van Den Broeck, W., Van Trappen, S., De Vos, P., Coulombet, C., Boon, N., Haesebrouck, F. et Decostere, A. (2016) *Vibrio lentus* protects gnotobiotic sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) larvae against challenge with *Vibrio harveyi*. *Vet. Microbiol.* 185, pp 41-48. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.01.024.
- Schikorski, D., Renault, T., Paillard, C., Bidault-Toffin, A., Tourbiez, D. et Saulnier, D. (2013) Development of TaqMan real-time PCR assays for monitoring *Vibrio harveyi* infection and a plasmid harbored by virulent strains in European abalone *Haliotis tuberculata* aquaculture. *Aquaculture* 392, pp 106-112. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.02.005.
- Schirmeister, F., Wieczorek, A., Dieckmann, R., Taureck, K. et Strauch, E. (2014) Evaluation of molecular methods to discriminate the closely related species *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii*. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 7, pp 851-857. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.09.001.
- Segawa, S., Sawai, S., Murata, S., Nishimura, M., Beppu, M., Sogawa, K., Watanabe, M., Satoh, M., Matsutani, T. et Kobayashi, M. (2014) Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis. *Clin. Chim. Acta* 435, pp 59-61. doi: 10.1016/j.cca.2014.04.024.
- Serrano, P. H. (2005) *Responsible use of antibiotics in aquaculture*, Vol. 469, Food & Agriculture Org. I.S.B.N.: 9251054363.
- Shen, G., Shi, C., Fan, C., Jia, D., Wang, S., Xie, G., Li, G., Mo, Z. et Huang, J. (2017) Isolation, identification and pathogenicity of *Vibrio harveyi*, the causal agent of skin ulcer disease in juvenile hybrid groupers *Epinephelus fuscoguttatus* × *Epinephelus lanceolatus*. *J. Fish Dis.* 40, 10, pp 1351-1362. doi: 10.1111/jfd.12609.
- Shikuma, N. J. et Hadfield, M. G. (2010) Marine biofilms on submerged surfaces are a reservoir for *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *Biofouling* 26, 1, pp 39-46. doi: 10.1080/08927010903282814
- Siboni, N., Balaraju, V., Carney, R., Labbate, M. et Seymour, J. R. (2016) Spatiotemporal dynamics of *Vibrio* spp. within the Sydney Harbour estuary. *Front. Microbiol.* 7, p 460. doi: 10.3389/fmicb.2016.00460.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K. et Viridi, J. S. (2015) MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* 6, p 791. doi: 10.3389/fmicb.2015.00791.
- Skaar, E. P. (2010) The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathog.* 6, 8. doi: 10.1371/journal.ppat.1000949.
- Smith, V. J., Brown, J. H. et Hauton, C. (2003) Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? *Fish Shellfish Immunol.* 15, 1, pp 71-90. doi: 10.1016/S1050-4648(02)00140-7.

- Snieszko, S.** (1974) The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J. Fish Biol.* 6, 2, pp 197-208. doi: 10.1111/j.1095-8649.1974.tb04537.x.
- Soffientino, B., Gwaltney, T., Nelson, D. R., Specker, J. L., Mauel, M. et Gómez-Chiarri, M.** (1999) Infectious necrotizing enteritis and mortality caused by *Vibrio carchariae* in summer flounder *Paralichthys dentatus* during intensive culture. *Dis. Aquat. Org.* 38, 3, pp 201-210. doi: 10.3354/dao038201.
- Song, X., Ma, Y., Fu, J., Zhao, A., Guo, Z., Malakar, P. K., Pan, Y. et Zhao, Y.** (2017) Effect of temperature on pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* biofilm formation. *Food Control* 73, pp 485-491. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.08.041.
- Sørum, H., Hvaal, A., Heum, M., Daae, F. et Wiik, R.** (1990) Plasmid profiling of *Vibrio salmonicida* for epidemiological studies of cold-water vibriosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and cod (*Gadus morhua*). *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 4, pp 1033-1037.
- Soto-Rodriguez, S., Roque, A., Lizarraga-Partida, M., Guerra-Flores, A. et Gomez-Gil, B.** (2003) Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana nauplii*. *Dis. Aquat. Org.* 53, 3, pp 231-240. doi: 10.3354/dao053231.
- Soto-Rodriguez, S. A., Gomez-Gil, B. et Lozano, R.** (2010) 'Bright-red'syndrome in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* is caused by *Vibrio harveyi*. *Dis. Aquat. Org.* 92, 1, pp 11-19. doi: 10.3354/dao02274.
- Soto-Rodriguez, S. A., Gomez-Gil, B., Lozano, R., del Rio-Rodríguez, R., Diéguez, A. L. et Romalde, J. L.** (2012) Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the "Bright-red" Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.* 109, 3, pp 307-317. doi: 10.1016/j.jip.2012.01.006.
- Srinivasan, R., Santhakumari, S. et Ravi, A. V.** (2017) *In-vitro* antibiofilm efficacy of Piper betle against quorum sensing mediated biofilm formation of luminescent *Vibrio harveyi*. *Microb. Pathog.* 110, pp 232-239. doi: 10.1016/j.micpath.2017.07.001.
- Staley, C., Gould, T. J., Wang, P., Phillips, J., Cotner, J. B. et Sadowsky, M. J.** (2015) Evaluation of water sampling methodologies for amplicon-based characterization of bacterial community structure. *J. Microbiol. Methods* 114, pp 43-50. doi: 10.1016/j.mimet.2015.05.003.
- Stalin, N. et Srinivasan, P.** (2017) Efficacy of potential phage cocktails against *Vibrio harveyi* and closely related *Vibrio* species isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India. *Vet. Microbiol.* 207, pp 83-96. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.06.006.
- Stephens, F., Raidal, S. R., Buller, N. et Jones, B.** (2006) Infection with *Photobacterium damsela* subspecies *damsela* and *Vibrio harveyi* in snapper, *Pagrus auratus* with bloat. *Aust. Vet. J.* 84, 5, pp 173-177. doi: 10.1111/j.1751-0813.2006.tb12774.x.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. et Costerton, J. W.** (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 1, pp 187-209. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160705.
- Stowe, S. D., Richards, J. J., Tucker, A. T., Thompson, R., Melander, C. et Cavanagh, J.** (2011) Anti-biofilm compounds derived from marine sponges. *Mar. Drugs* 9, 10, pp 2010-2035. doi: doi.org/10.3390/md9102010.

- Sugumar, G., Nakai, T., Hirata, Y., Matsubara, D. et Muroga, K. (1998) *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis. Aquat. Org.* **33**, 2, pp 111-118. doi: 10.3354/dao033111.
- Sun, B., Zhang, X.-H., Tang, X., Wang, S., Zhong, Y., Chen, J. et Austin, B. (2007) A single residue change in *Vibrio harveyi* hemolysin results in the loss of phospholipase and hemolytic activities and pathogenicity for turbot (*Scophthalmus maximus*). *J. Bacteriol.* **189**, 6, pp 2575-2579. doi: 10.1128/JB.01650-06.
- Sun, F., Chen, J., Zhong, L., Zhang, X.-h., Wang, R., Guo, Q. et Dong, Y. (2008) Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **64**, 1, pp 37-44.
- Sun, K., Hu, Y. H., Zhang, X. H., Bai, F. F. et Sun, L. (2009) Identification of *vhhP2*, a novel genetic marker of *Vibrio harveyi*, and its application in the quick detection of *V. harveyi* from animal specimens and environmental samples. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 4, pp 1251-1257. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04304.x.
- Svitil, A. L., Chadhain, S., Moore, J. A. et Kirchman, D. L. (1997) Chitin Degradation Proteins Produced by the Marine Bacterium *Vibrio harveyi* Growing on Different Forms of Chitin. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2, pp 408-413.

T

- Takemura, A. F., Chien, D. M. et Polz, M. F. (2014) Associations and dynamics of Vibrionaceae in the environment, from the genus to the population level. *Front. Microbiol.* **5**, p 38. doi: 10.3389/fmicb.2014.00038.
- Tasse, J., Croisier, D., Badel-Berchoux, S., Chavanet, P., Bernardi, T., Provot, C. et Laurent, F. (2016) Preliminary results of a new antibiotic susceptibility test against biofilm installation in device-associated infections: the Antibiofilmogram®. *Pathog. Dis.* **74**, 6. doi: 10.1093/femspd/ftw057.
- Teh, C., Chua, K. et Thong, K. L. (2010) Simultaneous differential detection of human pathogenic and nonpathogenic *Vibrio* species using a multiplex PCR based on *gyrB* and *pntA* genes. *J. Appl. Microbiol.* **108**, 6, pp 1940-1945. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04599.x.
- Tendencia, E. A. (2002) *Vibrio harveyi* isolated from cage-cultured seabass *Lates calcarifer* Bloch in the Philippines. *Aquacult. Res.* **33**, 6, pp 455-458.
- Teo, J. W., Zhang, L.-H. et Poh, C. L. (2003) Cloning and characterization of a novel lipase from *Vibrio harveyi* strain AP6. *Gene* **312**, pp 181-188. doi: 10.1016/S0378-1119(02)01151-4.
- Thaithongnum, S., Ratanama, P., Weeradechapol, K., Sukhoom, A. et Vuddhakul, V. (2006) Detection of *V. harveyi* in shrimp postlarvae and hatchery tank water by the Most Probable Number technique with PCR. *Aquaculture* **261**, 1, pp 1-9. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.07.001.

- Thompson, C. C., Vicente, A. C. P., Souza, R. C., Vasconcelos, A. T. R., Vesth, T., Alves, N., Ussery, D. W., Iida, T. et Thompson, F. L. (2009) Genomic taxonomy of vibrios. *BMC Evol. Biol.* 9, 1, p 258. doi: 10.1186/1471-2148-9-258.
- Thompson, F., Gevers, D., Thompson, C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., Munn, C. et Swings, J. (2005) Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 9, pp 5107-5115. doi: 10.1128/AEM.71.9.5107-5115.2005.
- Thompson, F. L., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K. et Swings, J. (2001) Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Syst. Appl. Microbiol.* 24, 4, pp 520-538. doi: 10.1078/0723-2020-00067
- Thompson, F. L., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Engelbeen, K., Denys, R. et Swings, J. (2002) *Vibrio trachuri* Iwamoto et al. 1995 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann et al. 1981. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 3, pp 973-976. doi: 10.1099/ijs.0.02046-0.
- Thompson, F. L., Iida, T. et Swings, J. (2004a) Biodiversity of vibrios. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 3, pp 403-431. doi: 10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004.
- Thompson, F. L. et Swings, J. (2006) Taxonomy of the vibrios dans *The biology of vibrios*. (Thompson, F., Austin, B., & Swings, J., Ed.), pp 29-43, American Society of Microbiology. I.S.B.N.: 9781683671787.
- Thompson, F. L., Gomez-Gil, B., Vasconcelos, A. T. R. et Sawabe, T. (2007) Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* are distinct species. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 13, pp 4279-4285. doi: 10.1128/AEM.00020-07.
- Thompson, J. R., Randa, M. A., Marcelino, L. A., Tomita-Mitchell, A., Lim, E. et Polz, M. F. (2004b) Diversity and dynamics of a North Atlantic coastal *Vibrio* community. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7, pp 4103-4110. doi: 10.1128/AEM.70.7.4103-4110.2004.
- Thompson, J. R. et Polz, M. F. (2006) Dynamics of *Vibrio* populations and their role in environmental nutrient cycling dans *The biology of vibrios*. (Thompson, F., Austin, B., & Swings, J., Ed.), pp 190-203, American Society of Microbiology. I.S.B.N.: 9781683671787.
- Tolker-Nielsen, T. et Sternberg, C. (2014) Methods for studying biofilm formation: flow cells and confocal laser scanning microscopy dans *Pseudomonas Methods and Protocols*. (Filloux, A., & Ramos, J.-L., Ed.), pp 615-629, Springer. I.S.B.N.: 978-1-4939-0473-0.
- Toranzo, A. E., Magariños, B. et Romalde, J. L. (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246, 1-4, pp 37-61. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.01.002.
- Travers, M.-A. (2008) Interaction de la bactérie *Vibrio harveyi* avec son hôte, l'ormeau *Haliotis tuberculata*: approches physiologiques, cellulaires et moléculaires. Thèse de l'université Université de Bretagne Occidentale, Brest.
- Travers, M.-A., Le Goïc, N., Huchette, S., Koken, M. et Paillard, C. (2008) Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone,

- Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 6, pp 800-808. doi: 10.1016/j.fsi.2008.08.003.
- Travers, M.-A., Meistertzheim, A.-L., Cardinaud, M., Friedman, C. S., Huchette, S., Moraga, D. et Paillard, C.** (2010) Gene expression patterns of abalone, *Haliotis tuberculata*, during successive infections by the pathogen *Vibrio harveyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 105, 3, pp 289-297. doi: 10.1016/j.jip.2010.08.001.
- Travers, M. A., Basuyaux, O., Le Goïc, N., Huchette, S., Nicolas, J. L., Koken, M. et Paillard, C.** (2009) Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Glob. Chang. Biol.* 15, 6, pp 1365-1376. doi: 10.1111/j.1365-2486.2008.01764.x.
- Trucksis, M., Michalski, J., Deng, Y. K. et Kaper, J. B.** (1998) The *Vibrio cholerae* genome contains two unique circular chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 24, pp 14464-14469. doi: 10.1073/pnas.95.24.14464.
- Tu, K. C. et Bassler, B. L.** (2007) Multiple small RNAs act additively to integrate sensory information and control quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Genes Dev.* 21, 2, pp 221-233. doi: 10.1101/gad.1502407.

U

- Urbanczyk, H., Ogura, Y. et Hayashi, T.** (2013a) Taxonomic revision of Harveyi clade bacteria (family Vibrionaceae) based on analysis of whole genome sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, PART7, pp 2742-2751. doi: 10.1099/ijs.0.051110-0.
- Urbanczyk, H., Ogura, Y. et Hayashi, T.** (2013b) Taxonomic revision of Harveyi clade bacteria (family Vibrionaceae) based on analysis of whole genome sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 7, pp 2742-2751. doi: 10.1099/ijs.0.051110-0
- Usbeck, J. C., Kern, C. C., Vogel, R. F. et Behr, J.** (2013) Optimization of experimental and modelling parameters for the differentiation of beverage spoiling yeasts by Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI–TOF MS) in response to varying growth conditions. *Food Microbiol.* 36, 2, pp 379-387. doi: 10.1016/j.fm.2013.07.004.
- Uzun, E. et Ogut, H.** (2015) The isolation frequency of bacterial pathogens from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the Southeastern Black Sea. *Aquaculture* 437, pp 30-37. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.11.017.

V

- Vadstein, O.** (1997) The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture* 155, 1-4, pp 401-417. doi: 10.1016/S0044-8486(97)00114-2.
- Vagianou, S., Athanassopoulou, F., Ragias, V., Di Cave, D., Leontides, L. et Golomazou, E.** (2006) Prevalence and pathology of ectoparasites of Mediterranean Sea

- breem and sea bass reared under different environmental and aquaculture conditions. *Isr. J. Aquacult.-Bamid.* 58, 2, pp 78-88.
- Valentine, N., Wunschel, S., Wunschel, D., Petersen, C. et Wahl, K.** (2005) Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1, pp 58-64. doi: 10.1128/AEM.71.1.58-64.2005.
- Van Kessel, J. C., Rutherford, S. T., Shao, Y., Utria, A. F. et Bassler, B. L.** (2013) Individual and combined roles of the master regulators AphA and LuxR in control of the *Vibrio harveyi* quorum-sensing regulon. *J. Bacteriol.* 195, 3, pp 436-443. doi: 10.1128/JB.01998-12.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. et Swings, J.** (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 60, 2, pp 407-438.
- Vandenberghe, J., Li, Y., Verdonck, L., Li, J., Sorgeloos, P., Xu, H. et Swings, J.** (1998) Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquaculture* 169, 1-2, pp 121-132. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00319-6.
- Vandeputte, M. et Piferrer, F.** (2019) Genetic and environmental components of sex determination in the European sea bass dans *Sex Control in Aquaculture*. (Wang, H. P., Piferrer, F., Chen, S. L., & Shen, Z. G., Ed.), pp 307-325. I.S.B.N.: 9781119127260
- Vanmaele, S., Defoirdt, T., Cleenwerck, I., De Vos, P. et Bossier, P.** (2015) Characterization of the virulence of Harveyi clade vibrios isolated from a shrimp hatchery in vitro and in vivo, in a brine shrimp (*Artemia franciscana*) model system. *Aquaculture* 435, pp 28-32. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.09.015.
- Vargha, M., Takáts, Z., Konopka, A. et Nakatsu, C. H.** (2006) Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates. *J. Microbiol. Methods* 66, 3, pp 399-409. doi: 10.1016/j.mimet.2006.01.006.
- Vázquez, F. J. S. et Muñoz-Cueto, J. A.** (2014) *Biology of European sea bass*, CRC Press. I.S.B.N.: 1466599456.
- Vazzana, M., Cammarata, M., Cooper, E. et Parrinello, N.** (2002) Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. *Aquaculture* 210, 1-4, pp 231-243. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00818-3.
- Velusamy, P., Kumar, G. V., Jeyanthi, V., Das, J. et Pachaiappan, R.** (2016) Bio-inspired green nanoparticles: synthesis, mechanism, and antibacterial application. *Toxicol. Res.* 32, 2, pp 95-102. doi: 10.5487/TR.2016.32.2.095.
- Vendramin, N., Zrncic, S., Padrós, F., Oraic, D., Le Breton, A., Zarza, C. et Olesen, N. J.** (2016) Fish health in Mediterranean Aquaculture, past mistakes and future challenges. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 36, 1, pp 38-45.
- Vezzulli, L., Pezzati, E., Brettar, I., Höfle, M. et Pruzzo, C.** (2015) Effects of Global Warming on *Vibrio* Ecology. *Microbiol. Spectrum*. doi: 10.1128/microbiolspec.VE-0004-2014.

- Vijayakumar, S., Vaseeharan, B., Malaikozhundan, B., Gobi, N., Ravichandran, S., Karthi, S., Ashokkumar, B. et Sivakumar, N.** (2017) A novel antimicrobial therapy for the control of *Aeromonas hydrophila* infection in aquaculture using marine polysaccharide coated gold nanoparticle. *Microb. Pathog.* 110, pp 140-151. doi: 10.1016/j.micpath.2017.06.029.
- Vikram, A., Jesudhasan, P. R., Jayaprakasha, G., Pillai, S. D. et Patil, B. S.** (2011) Citrus limonoids interfere with *Vibrio harveyi* cell-cell signalling and biofilm formation by modulating the response regulator LuxO. *Microbiology* 157, 1, pp 99-110. doi: 10.1099/mic.0.041228-0.
- Vishwakarma, J. et Sirisha, V.** (2020) Unraveling the anti-biofilm potential of green algal sulfated polysaccharides against *Salmonella enterica* and *Vibrio harveyi*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* doi: 10.1007/s00253-020-10653-5.
- Visick, K. L. et McFall-Ngai, M. J.** (2000) An exclusive contract: specificity in the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* partnership. *J. Bacteriol.* 182, 7, pp 1779-1787. doi: 10.1128/JB.182.7.1779-1787.2000.

W

- Wadhams, G. H. et Armitage, J. P.** (2004) Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 12, pp 1024-1037. doi: 10.1038/nrm1524.
- Waldor, M. K. et Mekalanos, J. J.** (1996) Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 272, 5270, pp 1910-1914. doi: 10.1126/science.272.5270.1910.
- Waldor, M. K. et RayChaudhuri, D.** (2000) Bacterial genomics: Treasure trove for cholera research. *Nature* 406, 6795, p 469.
- Wali, A. et Balkhi, M.** (2006) Fish vaccination and therapeutics. *Int. J. multidiscip. Res. Dev.* 3, 4, pp 55-60.
- Wang, S., Payne, G. F. et Bentley, W. E.** (2020) Quorum Sensing Communication: Molecularly Connecting Cells, Their Neighbors, and Even Devices. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 11. doi: 10.1146/annurev-chembioeng101519-124728.
- Wickham, H.** (2016) ggplot2: Elegant graphics for data analysis. Springer-Verlag, New York, USA, pp. 260.
- Williams, T. L., Andrzejewski, D., Lay, J. O. et Musser, S. M.** (2003) Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14, 4, pp 342-351. doi: 10.1016/S1044-0305(03)00065-5.
- Wilson, I. G.** (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 10, p 3741.
- Wolffs, P. F., Glencross, K., Thibaudeau, R. et Griffiths, M. W.** (2006) Direct quantitation and detection of salmonellae in biological samples without enrichment, using two-step filtration and real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6, pp 3896-3900. doi: 10.1128/AEM.02112-05.

- Won, K. M. et Park, S. I. (2008) Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to cultured marine fishes in Korea. *Aquaculture* **285**, 1-4, pp 8-13. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.08.013.
- Wong, H.-c., Wang, P., Chen, S.-Y. et Chiu, S.-W. (2004) Resuscitation of viable but non-culturable *Vibrio parahaemolyticus* in a minimum salt medium. *FEMS Microbiol. Lett.* **233**, 2, pp 269-275. doi: 10.1111/j.1574-6968.2004.tb09491.x.
- WoRMS. (2019) Word Register of Marine Species <http://www.marinespecies.org>. (Consulté le 20/09/2019)

X

- Xie, G., Johnson, S. L., Davenport, K. W., Rajavel, M., Waldminghaus, T., Detter, J. C., Chain, P. S. et Sozhamannan, S. (2017) Exception to the rule: genomic characterization of naturally occurring unusual *Vibrio cholerae* strains with a single chromosome. *Int. J. Genomics* **2017**. doi: 10.1155/2017/8724304.
- Xu, Q., Dziejman, M. et Mekalanos, J. J. (2003) Determination of the transcriptome of *Vibrio cholerae* during intrainestinal growth and midexponential phase in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3, pp 1286-1291. doi: 10.1073/pnas.0337479100.
- Xu, X., Liu, K., Wang, S., Guo, W., Xie, Z. et Zhou, Y. (2017) Identification of pathogenicity, investigation of virulent gene distribution and development of a virulent strain-specific detection PCR method for *Vibrio harveyi* isolated from Hainan Province and Guangdong Province, China. *Aquaculture* **468**, pp 226-234. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.10.015.

Y

- Yamaichi, Y., Iida, T., Park, K. S., Yamamoto, K. et Honda, T. (1999) Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*: presence of two chromosomes in *Vibrio* species. *Mol. Microbiol.* **31**, 5, pp 1513-1521. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01296.x.
- Yang, Q. et Defoirdt, T. (2015) Quorum sensing positively regulates flagellar motility in pathogenic *Vibrio harveyi*. *Environ. Microbiol.* **17**, 4, pp 960-968. doi: 10.1111/1462-2920.12420.
- Yano, Y., Hamano, K., Satomi, M., Tsutsui, I. et Aue-umneoy, D. (2011) Diversity and characterization of oxytetracycline-resistant bacteria associated with non-native species, white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), and native species, black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), intensively cultured in Thailand. *J. Appl. Microbiol.* **110**, 3, pp 713-722. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04926.x.
- Yardimci, R. et Timur, G. (2015) Isolation and identification of *Tenacibaculum maritimum*, the causative agent of Tenacibaculosis in farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) on the Aegean Sea coast of Turkey. *Isr. J. Aquacult.-Bamid.*

- Yii, K.-C., Yang, T.-I. et Lee, K.-K. (1997) Isolation and characterization of *Vibrio carchariae*, a causative agent of gastroenteritis in the groupers, *Epinephelus coioides*. *Curr. Microbiol.* **35**, 2, pp 109-115.
- Yildiz, F. H. et Visick, K. L. (2009) *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends Microbiol.* **17**, 3, pp 109-118. doi: 10.1016/j.tim.2008.12.004.
- Yokes, B., Pollard, D., Bizsel, C. Goren, M. & Kara, M.H. (2011) *Dicentrarchus labrax*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T135606A4158803.
- Yooseph, S., Nealson, K. H., Rusch, D. B., McCrow, J. P., Dupont, C. L., Kim, M., Johnson, J., Montgomery, R., Ferriera, S. et Beeson, K. (2010) Genomic and functional adaptation in surface ocean planktonic prokaryotes. *Nature* **468**, 7320, pp 60-66.

Z

- Zha, S., Liu, S., Su, W., Shi, W., Xiao, G., Yan, M. et Liu, G. (2017) Laboratory simulation reveals significant impacts of ocean acidification on microbial community composition and host-pathogen interactions between the blood clam and *Vibrio harveyi*. *Fish Shellfish Immunol.* **71**, pp 393-398. doi: 10.1016/j.fsi.2017.10.034.
- Zhang, W.-w., Sun, K., Cheng, S. et Sun, L. (2008) Characterization of DegQVh, a serine protease and a protective immunogen from a pathogenic *Vibrio harveyi* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 20, pp 6254-6262. doi: 10.1128/AEM.00109-08.
- Zhang, X.-H., Meaden, P. et Austin, B. (2001) Duplication of hemolysin genes in a virulent isolate of *Vibrio harveyi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 7, pp 3161-3167. doi: 10.1128/AEM.67.7.3161-3167.2001.
- Zhang, X.-H., He, X. et Austin, B. (2020) *Vibrio harveyi*: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. *J. Mar. Sci. Technol.*, pp 1-15. doi: 10.1007/s42995-020-00037-z.
- Zhang, X.-J., Bai, X.-S., Yan, B.-L., Bi, K.-R. et Qin, L. (2014) *Vibrio harveyi* as a causative agent of mass mortalities of megalopa in the seed production of swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Aquacult. Int.* **22**, 2, pp 661-672. doi: 10.1007/s10499-013-9695-9.
- Zhang, X., Lin, H., Wang, X. et Austin, B. (2018) Significance of *Vibrio* species in the marine organic carbon cycle - A review. *Sci. China: Earth Sci.* **61**, 10, pp 1357-1368. doi: 10.1007/s11430-017-9229-x.
- Zhang, X. H. et Austin, B. (2005) Haemolysins in *Vibrio* species. *J. Appl. Microbiol.* **98**, 5, pp 1011-1019. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02583.x.
- Zhou, Q. et Glasser, F. P. (2001) Thermal stability and decomposition mechanisms of ettringite at <120 °C. *Cem. Concr. Res.* **31**, 9, pp 1333-1339. doi: 10.1016/S0008-8846(01)00558-0.
- Zhou, S., Hou, Z., Li, N. et Qin, Q. (2007) Development of a SYBR Green I real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio alginolyticus* in seawater and seafood. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 5, pp 1897-1906. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03420.x.

-
- Zhu, Z., Dong, C., Weng, S. et He, J. (2018) The high prevalence of pathogenic *Vibrio harveyi* with multiple antibiotic resistance in scale drop and muscle necrosis disease of the hybrid grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *E. lanceolatus* (♂), in China. *J. Fish Dis.* 41, 4, pp 589-601. doi: 10.1111/jfd.12758.
- Zorrilla, I., Arijo, S., Chabrillon, M., Diaz, P., Martinez-Manzanares, E., Balebona, M. et Morinigo, M. (2003) *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. *J. Fish Dis.* 26, 2, pp 103-108. doi: 10.1046/j.1365-2761.2003.00437.x.

Annexes

Sommaire

Annexe 1	254
Adhesion to stainless steel surfaces and detection of viable but non cultivable cells of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> and <i>Vibrio cholerae</i> isolated from shrimps in seafood processing environments: <i>Stayin' alive?</i> (Article 4)	
Annexe 2	275
Characterization of the marine aquaculture microbiome: a seasonal survey in a seabass farm (Article 5)	

Annexe 1

Adhesion to stainless steel surfaces and detection of viable but non cultivable cells of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* isolated from shrimps in seafood processing environments: *Stayin' alive?*

Julia Mougina^{a,b,c,d,e,1}, Stéphanie Copin^{f,1}, Daline Bojolly^a, Virginie Raguenet^f, Annick Robert-Pillot^g, Marie-Laure Quilici^g, Graziella Midelet-Bourdin^f, Thierry Grard^a, Maryse Bonnin-Jusserand^a

^a Univ. Littoral Côte d'Opale, Convention ANSES, EA 7394 – ICV – Institut Charles Violette, F-62321, Boulogne-sur-Mer, France

^b INRA, France

^c Univ. Lille, F – 59000, Lille, France

^d ISA, F – 59000, Lille, France

^e Univ. Artois, F – 62000, Arras, France

^f French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), Laboratory for Food Safety, Boulevard du Bassin Napoléon, 62200, Boulogne-sur-Mer, France

^g Institut Pasteur, Paris, Unité des Bactéries Pathogènes Entériques, Centre National de Référence des Vibrions et du Choléra, France

¹ J. Mougina and S. Copin share co-authorship of this article.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, Biofilm, Shrimps, VBNC, PMA-qPCR, Seafood industries

Abstract

A single strain of *Vibrio parahaemolyticus* and a single strain of *Vibrio cholerae* were isolated from shrimps sourced from seafood processing plants. The isolated strains were evaluated for their ability to adhere to stainless steel surfaces, under conditions encountered in seafood industries. In this way, the impact of different environmental factors such as temperature (8 °C or 37 °C) and culture media (tryptic soy broth (TSB) 2% NaCl, artificial sea water (ASW) or industrial brine) were studied. The viability of these strains was analyzed by three different methods: the enumeration of cultivable bacteria on agar media, and two PCR methods, i.e. a qPCR and a PMA-qPCR method in order to distinguish between viable and dead cells. The proportion of viable but non-cultivable (VBNC) cells was evaluated by comparing the results of propidium monoazide real-time PCR (PMA-qPCR) with the enumeration results. Cultivable bacteria were not detected in brine, regardless of the conditions tested. However, *V. cholerae* in the VBNC state was detected in brine at 8 °C until 48 h of incubation. *V. cholerae* exhibited higher viability at 8 °C compared to 37 °C. *V. cholerae* also exhibited higher viability compared to *V. parahaemolyticus*. In contrast, for *V. parahaemolyticus*, temperature and media (except industrial brine) had little influence on cell viability and adhesion behavior.

1. Introduction

Seafood can be contaminated by Gram-negative bacteria of the genus *Vibrio* present in coastal areas. In particular, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* are two species potentially pathogenic for humans (Robert-Pillot, Copin, Himber, Gay, & Quilici, 2014). *V. cholerae* can be divided into two major groups: the cholera-causing strains of serogroups O1 and O139, and non-O1/non-O139 *V. cholerae*. The pathogenicity of the strains depends on virulence factors, the most important of which is the cholera toxin (CT) encoded by the *ctxA* and *ctxB* genes. The non-O1/non-O139 strains rarely possess these cholera toxin genes but may also cause human illness. *V. parahaemolyticus* has been implicated in more than 45% of all outbreaks of bacterial gastroenteritis worldwide, and this proportion is increasing with the emergence of pandemic strains spreading over large geographic areas (Nair *et al.*, 2007). Typical *V. parahaemolyticus*

illness results in mild to moderate acute gastroenteritis. As foodborne pathogens, *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae* are responsible for vibriosis outbreaks and represent a risk to consumer health, especially in case of ingestion of raw, undercooked or mishandled seafood (Bonnin-Jusserand *et al.*, 2017; Mizan, Jahid, & Ha, 2015). The risk associated with consumption of crustaceans, such as shrimps is well-documented for *V. parahaemolyticus* in several studies (Zarei, Borujeni, Jamnejad, & Khezzadeh, 2012; Abdullah Sani, Ariyawansa, Babji, & Hashim, 2013; Xu *et al.*, 2014) and for both *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae* in others (Rosec, Causse, Cruz, Rauzier, & Carnat, 2012; Yano *et al.*, 2014). *Vibrio* spp. can adopt specific survival strategies in harsh environments. They are found either free-living or associated with sediments, suspended particles and plankton (Thomas, Joseph, Raveendran, & Nair, 2006; Vezzulli *et al.*, 2010; Vezzulli, Colwell, & Pruzzo, 2013). Their ability to adhere to the surface of the exoskeleton of animals composed of chitin, some zooplankton organisms, especially copepods (Zidour *et al.*, 2017), and to plastic marine debris (Zettler, Mincer, & Amaral-Zettler, 2013) allows them to survive in seawater longer than in a free-living state. *Vibrio* spp. have the ability to form organized structures called biofilms on various biotic and abiotic surfaces (Watnick & Kolter, 1999). It has been shown that *Vibrio* spp. are able to form biofilms on aquaculture equipment such as larval rearing tanks (Bourne, Høj, Webster, Swan, & Hall, 2006) as well as on several other substrates, including glass, polystyrene, polyethylene and polyvinyl chloride (Snoussi *et al.*, 2009). *Vibrio* spp. biofilms have also been detected on fishing industry equipment (Bagge-Ravn *et al.*, 2003). Furthermore, biofilms represent a well-known hazard in the food industry (Shi & Zhu, 2009; Bridier *et al.*, 2015), and many environmental factors influence biofilm formation. For example, recent studies on the role of additives currently used in seafood processing, like NaCl and glucose, on the biofilm formation of *V. parahaemolyticus* on shrimp surfaces have been carried out (Mizan *et al.*, 2016). Within the biofilm, cells persist in different physiological stages, including in the viable but non cultivable (VBNC) state. The VBNC state is defined as a form of resistance of bacteria to adverse environmental conditions. The cells conserve their metabolic activity but cultivability is lost. Therefore, bacteria cannot be detected on agar Petri dishes (Oliver & Bockian, 1995). *V. parahaemolyticus* (Zhong *et al.*, 2017; Su, Jane, & Wong, 2013; Mizunoe, Wai, Ishikawa, Takade, & Yoshida, 2000) and *V. cholerae* (Rowan, 2004) can enter

the VBNC state. Importantly, the ISO standard 21872-1 applied to detect potentially pathogenic *Vibrio* in seafood cannot detect bacteria in the VBNC state. This could lead to underestimation of the bacterial population.

This study focused on the biofilm-forming ability on stainless steel of two different potentially pathogenic for humans *Vibrio* species (*V. cholerae* and *V. parahaemolyticus*) isolated from shrimps. The processing of shrimps in the seafood industry follows different steps (GBPH, 2016). Considering the possibility of a recontamination risk after cooking, brine could play a role by transporting *Vibrio*. Interestingly, there is no further critical control point (CCP) making it possible to limit the microbial population level after this step. Moreover, brine is recycled. Therefore, pathogen or spoilage flora could be present for instance in the VBNC state if renewal is not sufficiently frequent. VBNC cells could hardly be detected by classical microbiological methods and thus represent a potential risk for consumers. In order to estimate the VBNC proportion of *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae* within a biofilm closest to industrial conditions, in our study, the experiments required the comparison of three different techniques: qPCR, PMA-qPCR (propidium monoazide real-time PCR) (Zhong, Tian, Wang, Fang, & Liao, 2018; Zhu, Li, Jia, & Song, 2012; Wu, Liang, & Kan, 2015) and enumeration on agar plates. The influence of environmental parameters such as temperature and media, including industrial brine, has been assessed. The aim of this study consists of assessing the adhesion to stainless steel surfaces and detecting Viable But Non Cultivable cells of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* isolated from shrimps in seafood processing environments.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and culture conditions

Two environmental strains, isolated by the National Reference Laboratory (NRL: *Vibrio* sp. in fishery products), ANSES Boulogne-sur-mer, from seafood industries, were used in this study. The first one, *Vibrio parahaemolyticus* (ANSES collection 14-B3PA-0046) was isolated from shrimps imported from Nigeria. The second one, *Vibrio cholerae* (ANSES collection 09-B3PA-

2350) was isolated from shrimps imported from Madagascar. The strains were maintained in marine broth with 10% glycerol and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Prior to the experiments, bacteria were initially streaked on nutrient agar supplemented with 2% NaCl and incubated overnight at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. The strains were then transferred into tryptic soy broth (TSB 2% NaCl) and incubated overnight at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Subsequently, cells were centrifuged at $5,000\times g$ for 10 min and resuspended in TSB 2% NaCl or artificial sea water (ASW) or industrial brine (4 m^3 brine bath composed of water with a salinity of 1.17 ± 0.02 (> 1.10), pH 4). This step was repeated twice. Bacterial cell concentrations were adjusted to $10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ by spectrophotometry (LibraS11, BioChrom Ltd., Cambridge, UK). In order to check the bacterial concentrations, suitable dilutions of suspensions were made and plated on salted nutrient agar using an automatic spiral plater (easySpiral[®], Interscience, St-Nom-la-Bretèche, France). The plates were incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h. Cell numbers were then quantified using an automatic colony counter (Scan500[®], Interscience).

2.2. Preparation of 316 2B stainless steel coupons

AISI 316 2B (Fe/Cr18/Ni10/Mo3) stainless steel coupons ($37\times 16\times 1\text{ mm}$) were purchased from Goodfellow SARL (Lille, France). First of all, 316 2B stainless steel coupons were rubbed with paper, soaked in a 50% acetone/50% ethanol (v/v) solution. Coupons were then immersed in a 20% alkali detergent solution (v/v) (RBS50, cleaning agent; Chemical Products R. Borghgraef, Brussels, Belgium) at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ under agitation for 10 min. Coupons were rinsed in a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ water bath under agitation for 20 min. Five successive rinses of 1 min each were carried out in ultra-pure water, while stirring at room temperature. Coupons were autoclaved for 15 min, at $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3. Biofilm formation on stainless steel coupons

The bacterial suspension (11 mL) was transferred to a small sterile Petri dish ($67\text{ mm}\times 15\text{ mm}$) containing a sterile coupon. In order to create a humid atmosphere, the Petri dishes were then placed in bigger Petri dishes ($140\text{ mm}\times 20\text{ mm}$) containing paper towels soaked with 25 mL of

sterilized distilled water. Sterile medium was used as a negative control. The Petri dishes were inoculated at 8 °C or 37 °C for 3 h, 24 h and 48 h.

2.4. Quantification of viable, VBNC and dead cells attached to stainless steel coupons after 3 h, 24 h and 48 h of incubation at either 37 °C or 8 °C

After incubation, cell suspensions were removed and coupons were washed with 25 mL of sterile physiological water (0.9% NaCl) in order to remove non-adhered bacteria. Washed coupons were then transferred to sterile Petri dishes.

Two coupons were used per experiment. Each coupon was swabbed twice with the same swab. This swab was vortexed into a tube containing 2 mL of physiological water. A second swab, after undergoing the same process, was added to the same tube. This tube containing the two swabs was then vortexed for 20 s. The contents of the tube were divided into three fractions. Each fraction underwent one of the following three techniques:

- First fraction: the proportion of viable cultivable bacteria was obtained by plating serial dilutions on salted nutrient agar using an automatic spiral plater (easySpiral[®], Interscience). The plates were incubated at 37 °C for 24 h. Cell numbers were then quantified using an automatic colony counter (Scan500[®], Interscience).

- Second fraction: qPCR was used to amplify DNA of viable, VBNC and dead bacteria. Genomic DNA from cell suspensions (495 µL) was extracted using the DNeasy[®] Blood & Tissue Kit 250 (Qiagen, Courtabœuf, France), following the manufacturer's instructions. Then, *V. parahaemolyticus* DNA was quantified by qPCR following the protocol described by [Robert-Pillot et al. \(2014\)](#), with modifications. First at all, the LightCycler[®] 480 (Roche Diagnostics, France) was used for qPCR. The Qiagen Master Mix QuantiTect[®] Probe PCR Kit was used. This method was optimized for *V. cholerae*. Concentrations of reagents were adjusted to reach 4mM Mg²⁺ (Qiagen) and 6% glycerol using the Master Mix Light Cycler[®] 480 Probes Master

(Roche). The PCR cycling conditions were adjusted by including initial denaturation at 95 °C for 15 s, followed by annealing at 61 °C for 1 min, extension at 72 °C for 15 s.

- Third fraction: PMA-qPCR was used to amplify DNA of viable and VBNC bacteria. Propidium monoazide, PMA (Biotium Inc., Hayward, CA, USA) dissolved in ultra-pure water was added to 495 µL of cell suspension to reach a final concentration of 50 mM. Following an incubation period of 5 min in the dark, samples were light-exposed using a photo-activation system (PhAst Blue, GenIUL, Barcelona, Spain), with an intensity of 80 for 10 min. DNA from cell suspensions was extracted using the DNeasy® Blood & Tissue Kit 250 (Qiagen), following the manufacturer's instructions. Then, *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae* DNA was quantified by qPCR following the protocol described above for the second fraction. The genome equivalents (GEs) of the *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae* strains were calculated based on a *V. parahaemolyticus* genome of 5.0.10⁶ bp (Makino *et al.*, 2003) and on a *V. cholerae* genome of 4.0.10⁶ bp (Heidelberg *et al.*, 2000).

2.5. Microscopy observation

A coupon was used to image biofilm samples on stainless steel. The biofilm was stained for 15 min in the dark with 200 µL taken from a LIVE/DEAD® BacLight™ bacterial viability kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Residual LIVE/DEAD® BacLight™ solution was removed. Bacteria attached to the coupon were then examined in a wet state under an epifluorescence microscope (Imager.Z1, Zeiss, Marly-le-Roi, France) connected to a CCD camera (Axiocam - MRm, Zeiss) with apotome (×40 magnification). A minimum of five observations were taken for each observed coupon.

2.6. Statistical analysis

Biofilm experiments were carried out in triplicate (three independent experiments). Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) using R3.3.3 software (R Core Team, 2017). The ANOVA model was verified using a Shap-iro-Wilk normality test and Bartlett test of

homogeneity of variances. If the normality and homogeneity of variances of distribution were not verified, a Kruskal-Wallis test was carried out, followed by a post hoc test. Post hoc tests were performed with Bonferroni correction and Fisher's least significant difference (LSD) criterion, using the agricolae 1.2–8 package (De Mendibru, 2017). The results were expressed as means \pm standard error. Statistical significance was considered at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. *Vibrio parahaemolyticus* ANSES collection 14-B3PA-0046

3.1.1. Total population (viable cultivable, VBNC and dead bacteria; qPCR)

In TSB 2% NaCl and ASW broths, there was no impact of the incubation time at either 37 °C (Fig. 1) or 8 °C (Fig. 1) on the total population.

3.1.2. Viable cultivable and VBNC bacteria (PMA-qPCR)

In TSB 2% NaCl and ASW broths, the same proportion of bacteria was observed for 3 h (Fig. 1a, 1b), 24 h (Fig. 1c, 1d) and 48 h (Fig. 1e, 1f) at either 37 °C or 8 °C. No additional viable bacteria were detected in brine, regardless of the conditions (Fig. 1).

3.1.3. Viable cultivable bacteria (enumeration on Petri dishes)

A significant decrease in bacteria numbers was observed in TSB 2% NaCl broth depending on biofilm formation kinetics (3 h, 24 h and 48 h), regardless of the temperature ($p < 0.05$) (Fig. 1). However, in ASW broth, there were more adherent bacteria at time point 24 h (Fig. 1c, 1d) compared to 3 h (Fig. 1a, 1b) and 48 h (Fig. 1e, 1f), regardless of the temperature ($p < 0.05$). No viable cultivable bacteria were detected in brine at either 37 °C (Fig. 1) or 8 °C (Fig. 1).

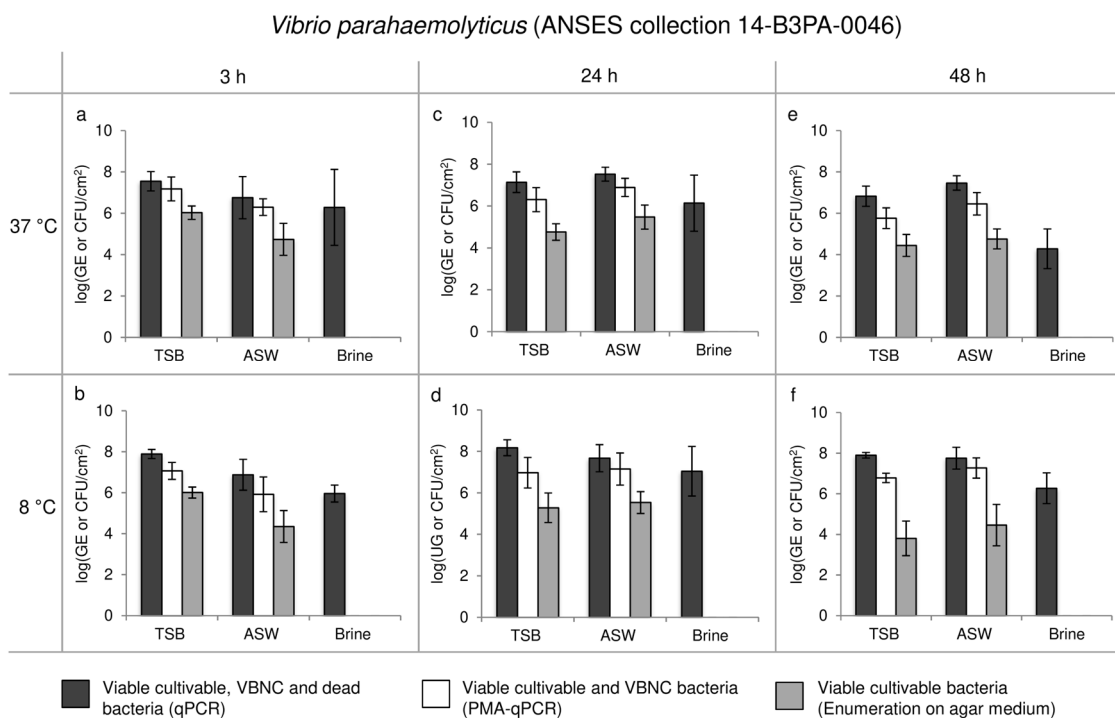


Figure 1. *Vibrio parahaemolyticus* ANSES collection 14-B3PA-0046 at 37 °C (a,c,e) and 8 °C (b,d,f): enumeration of total bacteria: viable cultivable, VBNC, and dead bacteria (qPCR: black squares); viable cultivable and VBNC bacteria (PMA-qPCR: white squares); viable cultivable bacteria (on Petri dishes: grey squares) for 3 h, 24 h and 48 h of incubation on TSB (2% NaCl), ASW and brine media. Values are expressed by means, ± 95% confidence interval, of three independent experiments.

3.4. *Vibrio cholerae* ANSES collection 09-B3PA-2350

3.4.1. Total population (viable cultivable, VBNC and dead bacteria; qPCR)

In TSB 2% NaCl broth, the total population had decreased at 37 °C at time point 48 h ($p < 0.05$) (Fig. 2e). Otherwise, the total population was almost equivalent at 8 °C at 3 h (Fig. 2b), 24 h (Fig. 2d) and 48 h (Fig. 2f). In ASW broth, there were no differences regardless of the incubation time or the temperature. In brine, equivalent bacteria proportions were detected at 8 °C, regardless of the incubation time (Fig. 2b, 2d, 2f). In contrast, bacterial populations had decreased at time point 48 h compared to 3 h and 24 h at 37 °C ($p < 0.05$) (Fig. 2a, 2c, 2e).

3.4.2. Viable cultivable and VBNC bacteria (PMA-qPCR)

In TSB 2% NaCl and ASW broths, the proportion of viable bacteria was equivalent regardless of the incubation time and temperature (Fig. 2). In brine, bacteria in the VBNC state were detected at 8 °C for each incubation time, including 48 h (Fig. 2b, 2d, 2f). This means that the VBNC *V. cholerae* cells remained in brine at 8 °C even for a long period of time. However, at 37 °C, at time point 48 h, viable bacteria were no longer detected (Fig. 2e). Indeed, results showed no amplification curve of PMA-qPCR for an incubation time of 48 h at 37 °C in brine only. Thus, all *V. cholerae* cells were dead (Fig. 2e).

3.4.3. Viable cultivable bacteria (enumeration on Petri dishes)

In TSB 2% NaCl, the proportion of viable cultivable bacteria was not significant regardless of the incubation time and the temperature (Fig. 2). In ASW, cultivable *V. cholerae* were not detected at 37 °C regardless of the incubation time (Fig. 2a, 2c, 2e). Furthermore, cultivable *V. cholerae* were not detected at 8 °C at time point 3 h (Fig. 2b), but the proportion of bacteria was equivalent at 8 °C at 24 h (Fig. 2d) and 48 h (Fig. 2f) of incubation. No additional viable cultivable *V. cholerae* were detected in brine, regardless of the incubation time and temperature (Fig. 2).

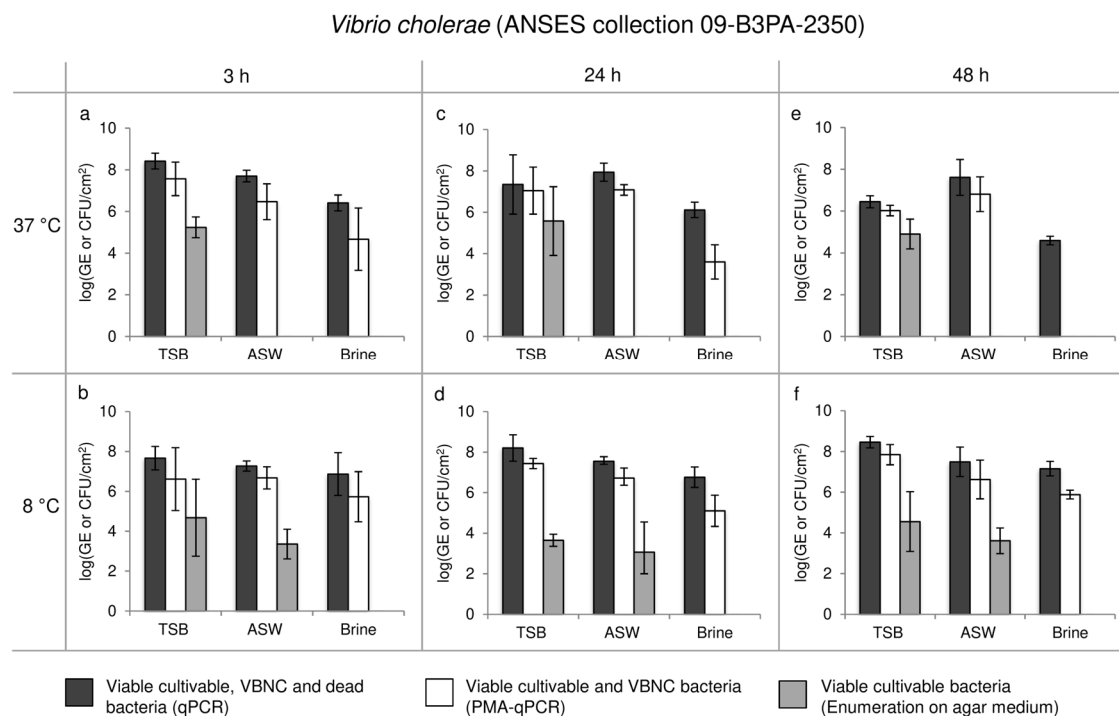


Figure 2. *Vibrio cholerae* ANSES collection 09-B3PA-2350 at 37 °C (a,c,e) and 8 °C (b,d,f): enumeration of total bacteria (qPCR: black squares); viable and VBNC bacteria (PMA-qPCR: white squares); viable cultivable bacteria (on Petri dishes: grey squares) for 3 h, 24 h and 48 h of incubation on TSB (2% NaCl), ASW and brine media. Values are expressed by means, \pm 95% confidence interval, of three independent experiments.

3.5. Comparisons between *V. cholerae* and *V. parahaemolyticus* in brine for an incubation time of 48 h

In Brine, for an incubation time of 48 h, temperature had significant effect on the adhesion of total bacteria regardless *Vibrio* species. Indeed, more bacteria were detected at 8 °C compared to 37 °C (Fig. 3.1).

VBNC cells of *V. parahaemolyticus* were no longer detected either at 37 °C or 8 °C, while VBNC cells of *V. cholerae* were detected at 8 °C only. According to these results, the adhesion of VBNC cells could be strain-dependent. Moreover, these results demonstrated that temperature has a significant effect on the adhesion of VBNC *V. cholerae* cells in brine (Fig. 3.2).

Viable cultivable bacteria were not detected either at 37 °C or 8 °C on Petri dishes (Fig. 3.3).

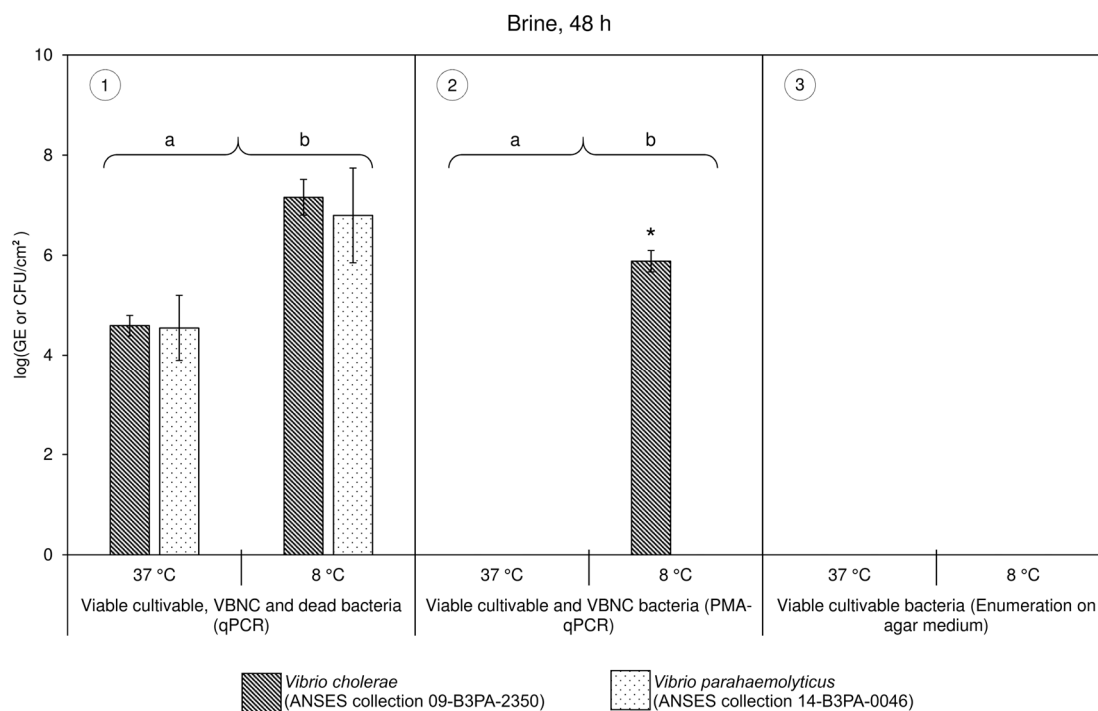


Figure 3. *Vibrio cholerae* ANSES collection 09-B3PA-2350 (hatched squares) and *Vibrio parahaemolyticus* ANSES collection 14-B3PA-0046 (spotted squares) in brine for 48 h, at 37 °C and 8 °C; Enumeration of (1) total bacteria (qPCR); (2) Viable and VBNC bacteria (PMA-qPCR); (3) Viable cultivable bacteria (on Petri dishes). Values are expressed by means, $\pm 95\%$ confidence interval, of three independent experiments. The letters a and b represent differences between treatments with two temperatures, according to post hoc tests. The “*” represents differences between strains at the same temperature, according to post hoc tests.

3.6. Observations of adherent cells

Micro-colonies were observed at 37 °C and 8 °C for *V. parahaemolyticus* at time points 3 h, 24 h and 48 h (Fig. 4). In brine, aggregates were observed from the early stages of adhesion (3 h), regardless of the temperature (Fig. 4g, 4.p).

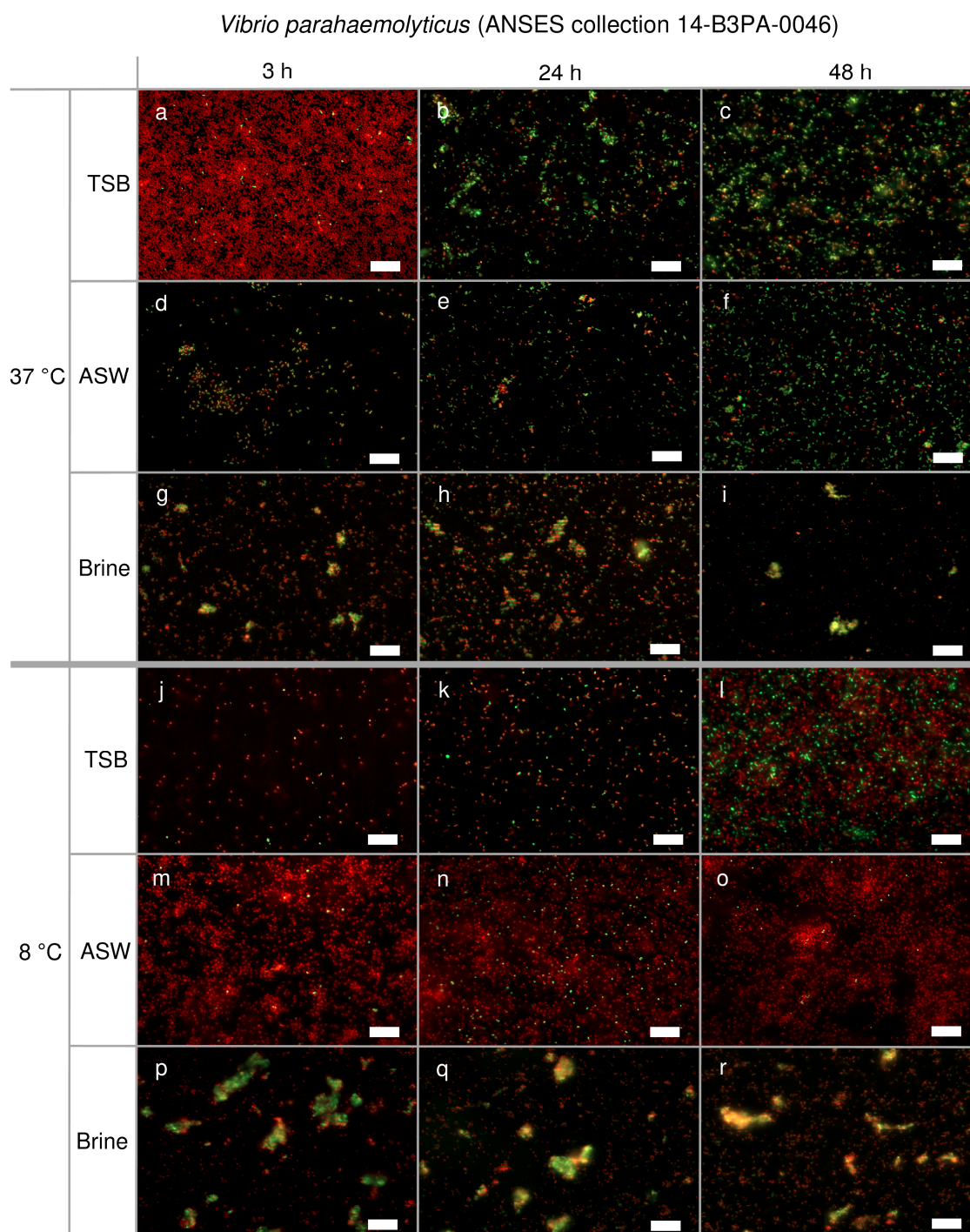


Figure 4. *Vibrio parahaemolyticus* ANSES collection 14-B3PA-0046 at 37 °C (a,b,c,d,e,f,g,h,i) and 8 °C (j,k,l,m,n,o,p,q,r): relevant microscopic photographs of stainless steel coupons after LIVE/DEAD® BacLight™ staining for 3 h, 24 h and 48 h of incubation on TSB (2% NaCl), ASW and brine media. Experiments were repeated three times and a minimum of five images were taken for each observed stainless steel coupon.

These observations clearly showed a mix of live and dead bacteria during the establishment of these aggregates. Regarding *V. cholerae* (Fig. 5), dense cell clusters were observed from 3 h at 37 °C in TSB 2% NaCl (Fig. 5a). These clusters decreased at 48 h, suggesting dispersal of the biofilm (Fig. 5c). However, at 8 °C at time point 48 h (Fig. 5.l), clusters especially composed of dead cells were still present. In ASW broth, minor changes in the structure of the biofilm were observed, regardless of the temperature and the incubation time (Fig. 5d, 5e, 5f, 5.m, 5.n, 5.o). In brine, small aggregates were observed regardless of the temperature and time (Fig. 5g, 5h, 5i, 5.p, 5.q, 5.r). No further viable *V. cholerae* were observed in brine at 37 °C at time point 48 h (Fig. 5i). Viable bacteria could be VBNC cells not detected by the molecular methods used or Petri dish enumeration. This could be explained by a detection threshold level of the techniques used that may be too low.

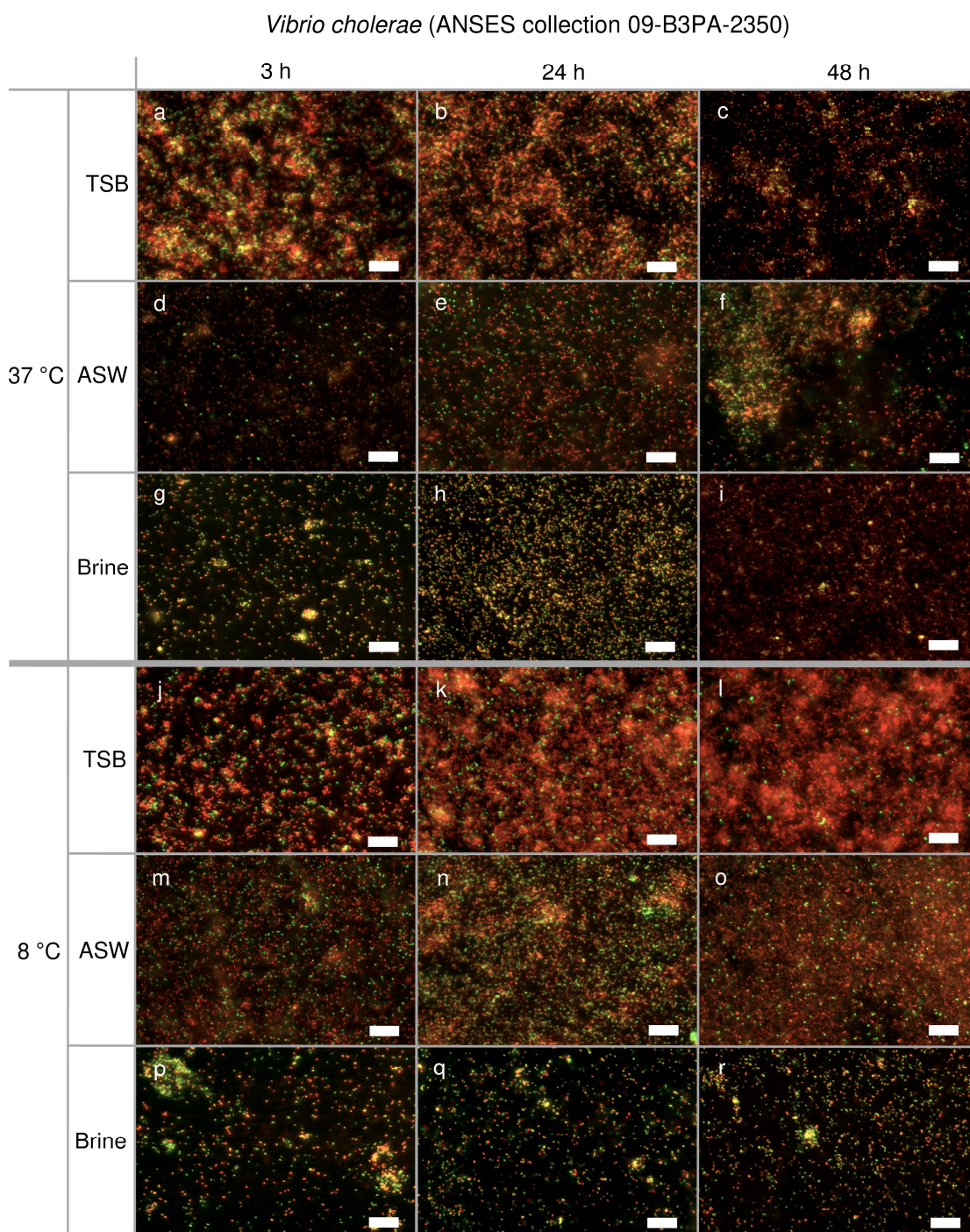


Figure 5. *Vibrio cholerae* ANSES collection 09-B3PA-2350 at 37 °C (a,b,c,d,e,f,g,h,i) and 8 °C (j,k,l,m,n,o,p,q,r): relevant microscopic photographs of stainless steel coupons after LIVE/DEAD® BacLight™ staining for 3 h, 24 h and 48 h of incubation on TSB (2% NaCl), ASW and brine media. Experiments were repeated three times and a minimum of five images were taken for each observed stainless steel coupon.

4. Discussion

This study provides a deeper understanding of the viability of bacteria inside the biofilm. qPCR and PMA-qPCR methods were developed for both *Vibrio* species, in addition to cell enumeration on agar. Importantly, the combined findings of these three techniques and their comparison provided the proportions of viable cultivable, VBNC and dead bacteria. Additionally, microscopy using a LIVE/DEAD® staining kit coupled with Apotome technology enabled us to supplement the results obtained by the methods mentioned above. In this way, we were able to observe bacterial adhesion on stainless steel coupons. These observations were corroborated by results obtained by enumeration on agar plates and molecular biology (qPCR and PMA-qPCR methods).

Many factors influence biofilm formation: the bacteria themselves, that is to say their own genetics and physiology, the type of attachment surface, and the environment (pH, temperature, nutrient availability) (Whitehead & Verran, 2015). Among these factors, temperature seems to play a key role in *Vibrio* biofilm formation. In this study, small differences were observed regarding *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae* biofilms at either 37 °C or 8 °C, regardless of the incubation time (3 h, 24 h, 48 h). Indeed, the only significant influence of temperature determined was in brine but no influence was detected in TSB or ASW broths. Nonetheless, Ahmed *et al.* (2018) showed that the biofilm formation of *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae* was significantly higher at 37 °C and 25 °C than at 4 °C. In the study carried out by Beshiru and Igbinsosa (2018), *V. cholerae* showed better abilities to form biofilm at 21 °C and 37 °C, while the highest biofilm production of *V. parahaemolyticus* was observed at 30 °C in TSB under dynamic culture. Similarly, Song *et al.* (2017) observed better biofilm production of *V. parahaemolyticus* in TSB 3% NaCl at 25 °C compared to 15 °C and 37 °C. Han, Mizan, Jahid, and Ha (2016) showed that *V. parahaemolyticus* biofilm formation was better at 30 °C than 4 °C on stainless steel coupons immersed in fresh water. Furthermore, Wong, Chung, and Yu (2002) showed that bacterial adhesion on stainless steel surfaces decreased when *V. parahaemolyticus* was incubated at 4 °C. All these results showed better biofilm formation for high temperatures

(between 21 °C and 37 °C) compared to 4 °C, contrary to our findings. Adhesion is also media-dependent. In this study, we did not observe the same behavior on either TSB 2% NaCl or ASW between *Vibrio* spp. *V. parahaemolyticus* exhibited the same behavior in TSB or ASW, regardless of the incubation temperature. However, in ASW for 24 h and 48 h, better survival was observed for *V. cholerae* at 8 °C compared to 37 °C due to the presence of viable cultivable bacteria. The amount of viable cultivable bacteria at 37 °C in ASW was not higher than in TSB. Wong *et al.* (2002) showed that *V. parahaemolyticus* exhibited better adhesion on stainless steel when cultured in chemically defined MM9 medium than TSB. Regarding *V. cholerae*, this behavior was dependent on the temperature of incubation. At 8 °C for 24 h and 48 h, there were no differences in adhesion on either TSB 2% NaCl or ASW. The fact that a nutrient-poor medium promotes adhesion has already been shown especially for *L. monocytogenes* (Kadam *et al.*, 2013). The composition of ASW medium is close to that of the marine environment, which is the natural habitat of *Vibrio*. Therefore, better biofilm formation ability could be expected in this medium, which was not the case in our study. Moreover, Beshiru and Igbinsosa (2018) showed that *V. cholerae* and *V. parahaemolyticus* biofilm formation was not medium-dependent (even when the medium was rich or poor). Both tested strains also exhibited different behaviors in brine. Indeed, in this study, only dead bacteria were detected regardless of the temperature and incubation time for *V. parahaemolyticus*. However, VBNC bacteria of *V. cholerae* were detected at 37 °C for 3 h and 24 h. VBNC cells were detected for each incubation time at 8 °C. These results indicate a greater survival capacity of *V. cholerae* at 8 °C than at 37 °C in poor media. The induction of the VBNC state is triggered by a low temperature, more often 4 °C, and under starvation conditions (Zhong *et al.*, 2018; Su *et al.*, 2013; Wong, Wang, Chen, & Chiu, 2004). This could explain the presence of VBNC cells of *V. cholerae* in brine at 8 °C.

As for temperature and media, bacterial adhesion depends on the food contact surface. Stainless steel coupons were used in this study to mimic the conditions encountered in seafood industries. Also, Han *et al.* (2016) studied *V. parahaemolyticus* biofilm formation on stainless steel, crab and shrimp. In addition to surface hydrophobicity, cell hydrophobicity must also be taken into account: *Vibrio* are strongly hydrophilic (Beshiru & Igbinsosa, 2018). However, it is difficult to compare

studies of *Vibrio* biofilms with one another because, most of the time, biofilm formation was studied via the microtiter plate assay with crystal violet staining. This assay remains a useful screening tool, but does not reflect real biofilm formation conditions; in particular, the surface type is not considered. Moreover, *Vibrio* biofilm formation is strain-dependent (Song *et al.*, 2017; Odeyemi & Ahmad, 2017; Mizan *et al.*, 2016; Wong *et al.*, 2002). To supplement our results, different *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae* strains of different origins (isolated from different seafood products or different countries), including pathogenic strains (carrying pathogenicity factors such as *ctxA/ctxB* genes for *V. cholerae* and *tdh* or *trh* genes for *V. parahaemolyticus*) should be assessed. Clearly, biofilm formation may be different depending on the strain's origin. The formation of mixed biofilm, for example *Vibrio* in association with *Listeria monocytogenes*, could also be evaluated. In addition to developing survival strategies (VBNC, biofilm), strains are constantly adapting to their environment. More and more studies point to the extent of antibiotic resistance for *Vibrio* (Yano *et al.*, 2014). This characteristic should therefore be taken into account in the biofilm survival state. Elexson *et al.* (2014) tested several detergents against biofilms of antibiotic-resistant *V. parahaemolyticus* isolated from seafood and found hygiene issues and cross-contamination hazards in the seafood industries.

5. Conclusion

For the first time, the cell viability was taken into account in order to better understand the survival strategies of potentially pathogenic human *Vibrio*. The aim of this study was to get as close as possible to the conditions encountered in seafood industries, even if this test remained *in vitro* for the standardization and exploitation purposes of the results. This scoping study highlighted the behavior of both *Vibrio* strains under laboratory conditions for different environmental parameters. Despite the fact that there are few data on the risk for consumer health of *V. cholerae* from shrimps, the strain tested in this study showed a greater survival capacity than the *V. parahaemolyticus* strain. Indeed, VBNC *V. cholerae* cells were detected at 8 °C in brine for each incubation time, including 48 h. Therefore, it could be useful to monitor *V. cholerae* contamination in shrimps. Seafood processing companies need to be aware of and

take into account the *Vibrio* risk in their hazard analysis critical control point (HACCP) approach. The possible presence of VBNC cells cannot be ruled out. The use of molecular biology methods like PMA-qPCR is recommended to ensure the safety of seafood products.

Acknowledgements

Julia Mougin would like to thank the “Hauts-de-France” regional council for its financial support of her PhD studies. This work was funded by the French government and the region Hauts-de-France in the framework of the CPER 2014–2020 MARCO project. This work was supported by a grant from FranceAgriMer (2014-0813) as part of the SURVIB project. The authors also thank the CITPPM (Confédération des industries de traitement des produits des pêches maritimes et de l'aquaculture) as a contributor to the SURVIB project. The authors are also grateful to Thomas Brauge for his scientific assistance, to Cindy Ducrocq and Marie-Ange Huchin for technical assistance and to Alexandre Dehaut for advices in statistical analyses.

References

- Abdullah Sani, N., Ariyawansa, S., Babji, A. S., & Hashim, J. K. (2013). The risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in cooked black tiger shrimps (*Penaeus monodon*) in Malaysia. *Food Control*, 31(2), 546–552.
- Ahmed, H. A., El Bayomi, R. M., Hussein, M. A., Khedr, M. H. E., Abo Remela, E. M., & ElAshram, A. M. M. (2018). Molecular characterization, antibiotic resistance pattern and biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. cholerae* isolated from crustaceans and humans. *Int. J. Food Microbiol.*, 274, 31–37.
- Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J. N., Johansen, C., & Gram, L. (2003). The microbial ecology of processing equipment in different fish industries - analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *Int. J. Food Microbiol.*, 87(3), 239–250.
- Beshiru, A., & Igbiosa, E. O. (2018). Characterization of extracellular virulence properties and biofilm-formation capacity of *Vibrio* species recovered from ready-to-eat (RTE) shrimps. *Microb. Pathog.*, 119, 93–102.
- Bonnin-Jusserand, M., Copin, S., Le Bris, C., Brauge, T., Gay, M., Brisabois, A., et al. (2017). *Vibrio* species involved in seafood-borne outbreaks (*Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*): Review of microbiological versus recent molecular detection methods in seafood products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1–14.
- Bourne, D. G., Høj, L., Webster, N. S., Swan, J., & Hall, M. R. (2006). Biofilm development within a larval rearing tank of the tropical rock lobster *Panulirus ornatus*. *Aquaculture*, 260(1–4), 27–38.
- Bridier, A., Sanchez-Vizueté, P., Guilbaud, M., Piard, J.-C., Naïtali, M., & Briandet, R. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiol.*, 45, 167–178.
- De Mendibru, F. A. (2017). Statistical procedures for agricultural research. R package version 1.2-4. 2016.
- Elexson, N., Afsah-Hejri, L., Rukayadi, Y., Soopna, P., Lee, H. Y., Tuan Zainazor, T. C., et al. (2014). Effect of detergents as antibacterial agents on biofilm of antibiotics-resistant *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Food Control*, 35(1), 378–385.
- GBPH (2016). Guides de bonnes pratiques d'hygiène : Crustacés cuits, Vol 5961. Han, N., Mizan, M. F. R.,

- Jahid, I. K., & Ha, S.-D. (2016). Biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus* on food and food contact surfaces increases with rise in temperature. *Food Control*, 70, 161–166.
- Heidelberg, J. F., Eisen, J. A., Nelson, W. C., Clayton, R. A., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., et al. (2000). DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature*, 406(6795), 477.
- Kadam, S. R., den Besten, H. M., van der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., & Abee, T. (2013). Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. *Int. J. Food Microbiol.*, 165(3), 259–264.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., et al. (2003). Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: A pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet*, 361(9359), 743–749.
- Mizan, M. F. R., Jahid, I. K., & Ha, S.-D. (2015). Microbial biofilms in seafood: A foodhygiene challenge. *Food Microbiol.*, 49,41–55.
- Mizan, M. F., Jahid, I. K., Kim, M., Lee, K. H., Kim, T. J., & Ha, S. D. (2016). Variability in biofilm formation correlates with hydrophobicity and quorum sensing among *Vibrio parahaemolyticus* isolates from food contact surfaces and the distribution of the genes involved in biofilm formation. *Biofouling*, 32(4), 497–509.
- Mizunoe, Y., Wai, S. N., Ishikawa, T., Takade, A., & Yoshida, S.-i. (2000). Resuscitation of viable but non culturable cells of *Vibrio parahaemolyticus* induced at low temperature under starvation. *FEMS Microbiol. Lett.*, 186(1), 115–120.
- Nair, G. B., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S. K., Dutta, B., Takeda, Y., & Sack, D. A. (2007). Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3: K6 and its serovariants. *Clin. Microbiol. Rev.*, 20(1), 39–48.
- Odeyemi, O. A., & Ahmad, A. (2017). Population dynamics, antibiotics resistance and biofilm formation of *Aeromonas* and *Vibrio* species isolated from aquatic sources in Northern Malaysia. *Microb. Pathog.*, 103, 178–185.
- Oliver, J. D., & Bockian, R. (1995). In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(7), 2620–2623.
- R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing (version 3.4. 2) [Computer software]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Robert-Pillot, A., Copin, S., Himber, C., Gay, M., & Quilici, M.-L. (2014). Occurrence of the three major *Vibrio* species pathogenic for human in seafood products consumed in France using real-time PCR. *Int. J. Food Microbiol.*, 189,75–81.
- Rosec, J.-P., Causse, V., Cruz, B., Rauzier, J., & Carnat, L. (2012). The international standard ISO/TS 21872–1 to study the occurrence of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in seafood: ITS improvement by use of a chromogenic medium and PCR. *Int. J. Food Microbiol.*, 157, 189–194.
- Rowan, N. J. (2004). Viable but non-culturable forms of food and waterborne bacteria: Quo Vadis? *Trends in Food Science & Technology*, 15(9), 462–467.
- Shi, X., & Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci. Technol.*, 20(9), 407–413.
- Snoussi, M., Noumi, E., Hajlaoui, H., Usai, D., Sechi, L. A., Zanetti, S., et al. (2009). High potential of adhesion to abiotic and biotic materials in fish aquaculture facility by *Vibrio alginolyticus* strains. *J. Appl. Microbiol.*, 106(5), 1591–1599.
- Song, X., Ma, Y., Fu, J., Zhao, A., Guo, Z., Malakar, P. K., et al. (2017). Effect of temperature on pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* biofilm formation. *Food Control*, 73, 485–491.
- Su, C. P., Jane, W. N., & Wong, H. C. (2013). Changes of ultrastructure and stress tolerance of *Vibrio parahaemolyticus* upon entering viable but nonculturable state. *Int. J. Food Microbiol.*, 160(3), 360–366.
- Thomas, K. U., Joseph, N., Raveendran, O., & Nair, S. (2006). Salinity-induced survival strategy of *Vibrio cholerae* associated with copepods in Cochin backwaters. *Mar. Pollut. Bull.*, 52(11), 1425–1430.
- Vezzulli, L., Colwell, R. R., & Pruzzo, C. (2013). Ocean warming and spread of pathogenic Vibrios in the aquatic environment. *Microb. Ecol.*, 65(4), 817–825.
- Vezzulli, L., Previati, M., Pruzzo, C., Marchese, A., Bourne, D. G., & Cerrano, C. (2010). *Vibrio* infections triggering mass mortality events in a warming Mediterranean Sea. *Environ. Microbiol.*, 12(7), 2007–2019.
- Watnick, P. I., & Kolter, R. (1999). Steps in the development of a *Vibrio cholerae* el tor biofilm. *Mol. Microbiol.*, 34(3), 586–595.
- Whitehead, K. A., & Verran, J. (2015). Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry. *Curr. Opin. Food Sci.*, 2,84–91.
- Wong, H.-C., Chung, Y.-C., & Yu, J.-A. (2002). Attachment and inactivation of

- Vibrio parahaemolyticus* on stainless steel and glass surface. *Food Microbiology*, 19(4), 341–350.
- Wong, H. C., Wang, P., Chen, S. Y., & Chiu, S. W. (2004). Resuscitation of viable but non culturable *Vibrio parahaemolyticus* in a minimum salt medium. *FEMS Microbiol. Lett.*, 233(2), 269–275.
- Wu, B., Liang, W., & Kan, B. (2015). Enumeration of viable non-culturable *Vibrio cholerae* using propidium monoazide combined with quantitative PCR. *J. Microbiol. Methods*, 115, 147–152.
- Xu, X., Wu, Q., Zhang, J., Cheng, J., Zhang, S., & Wu, K. (2014). Prevalence, pathogenicity, and serotypes of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp from Chinese retail markets. *Food Control*, 46, 81–85.
- Yano, Y., Hamano, K., Satomi, M., Tsutsui, I., Ban, M., & Aue-umneoy, D. (2014). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio* species related to food safety isolated from shrimp cultured at inland ponds in Thailand. *Food Control*, 38, 30–36.
- Zarei, M., Borujeni, M. P., Jamnejad, A., & Khezzadeh, M. (2012). Seasonal prevalence of *Vibrio* species in retail shrimps with an emphasis on *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Control*, 25, 107–109.
- Zettler, E. R., Mincer, T. J., & Amaral-Zettler, L. A. (2013). Life in the "plastisphere": Microbial communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.*, 47(13), 7137–7146.
- Zhong, Q., Tian, J., Wang, J., Fang, X., & Liao, Z. (2018). iTRAQ-based proteomic analysis of the viable but non culturable state of *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 induced by food preservative and low temperature. *Food Control*, 85, 369–375.
- Zhong, H., Zhong, Y., Deng, Q., Zhou, Z., Guan, X., Yan, M., et al. (2017). Virulence of thermolabile haemolysin *tlh*, gastroenteritis related pathogenicity *tdh* and *trh* of the pathogens *Vibrio parahaemolyticus* in Viable but Non-Culturable (VBNC) state. *Microb. Pathog.*, 111, 352–356.
- Zhu, R. G., Li, T. P., Jia, Y. F., & Song, L. F. (2012). Quantitative study of viable *Vibrio parahaemolyticus* cells in raw seafood using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *J. Microbiol. Methods*, 90(3), 262–266.
- Zidour, M., Chevalier, M., Belguesmia, Y., Cudennec, B., Grard, T., Drider, D., et al. (2017). Isolation and characterization of bacteria colonizing *Acartia tonsa* copepod eggs and displaying antagonist effects against *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* and other pathogenic strains. *Front. Microbiol.*, 8 (1919).

Annexe 2

Characterization of the marine aquaculture microbiome: a seasonal survey in a seabass farm

Roxane Roquigny¹, Julia Mougin¹, Cédric Le Bris¹, Maryse Bonnin-Jusserand¹, Périne Doyen¹ and Thierry Grard¹

¹ Univ. Littoral Côte d'Opale, UMR 1158 BioEcoAgro, Institut Charles Viollette, USC ANSES, INRAe, Univ. Lille, Univ. Artois, Univ. Picardie Jules Verne, Univ. Liège, Yncréa, F-62200 Boulogne-sur-Mer, France

Keywords: seabass farm microbiomes, biofilms, tank water, 16S rRNA gene sequencing, Vibrionaceae.

Abstract

Vibriosis is a recurrent disease in marine aquaculture environments. Monitoring the dynamics of bacterial populations in several compartments of the aquaculture infrastructure is of paramount importance to understand the occurrence of the disease. In the present study, the fish farm, located in the north of France, is a flow-through system where the tanks are supplied by two water inlets. Water from breeding tanks, and inlets and the biofilms in the tanks were sampled weekly in a seabass farm for 7 months. DNA was extracted from 477 samples to sequence the variable V4-V5 region of the 16S rRNA gene and analyze the sequences using the QIIME2 platform. Proteobacteria (54.52%) and Bacteroidetes (26.85%) composed more than 80% of the phylum diversity. Alpha- and beta-diversity indicators showed that bacterial communities were more diverse in samples from biofilms and tanks than in samples from water inlets. Some families were specific to one compartment, e.g. ammonium-oxidizing bacteria in biofilms, whereas Vibrionaceae family isolates were mostly found in tank water samples. Taxa were determined up to the species level for the Vibrionaceae. Besides, all six determined genera of Vibrionaceae were

identified, with mostly *Vibrio* and *Photobacterium* isolates detected in almost all samples. Vibrionaceae persisted over time in the biofilms. Our results suggest that biofilms may be a potential reservoir in case of dysbiosis. This study helps better understand microbial interactions, especially with Vibrionaceae in aquaculture environments.

1. Introduction

Over the past decade, aquaculture mass production has increased worldwide (Ahmed *et al.*, 2019). European seabass (*Dicentrarchus labrax*, L.) is one of the most farmed aquaculture species produced with a production about 191,000 t in 2016 (FAO, 2005-2020). Aquaculture is a fast-growing sector whose growth is limited by several challenges. There are geographic factors, such as the availability of water and land, as well as environmental factors such as the pollution of coastal zones (Ahmed *et al.*, 2015). Disease outbreaks remain one of the main challenges, responsible for severe fish losses, leading to the loss of billions of dollars every year (Lafferty *et al.*, 2015).

Belonging to Gammaproteobacteria, the Vibrionaceae family is composed of six well-identified genera and more than 140 species (Thompson *et al.*, 2004). It is one of the most predominant bacterial groups in marine environments with a worldwide distribution (Ina-Salwany *et al.*, 2019, Thompson *et al.*, 2004). Several Vibrionaceae species have been identified as pathogens of farmed aquatic animals. Specifically, the *Vibrio*, *Photobacterium* and *Aliivibrio* genera are responsible for vibriosis (Ina-Salwany *et al.*, 2019). Lethargy, skin lesions and hemorrhagic septicemia characterize affected fish (Ina-Salwany *et al.*, 2019). On the one hand, global warming stimulates the occurrence of the repeated vibriosis outbreaks in farming systems (Travers *et al.*, 2009, Vezzulli *et al.*, 2015). On the other hand, biofilm formation enhances the virulence and the persistence of Vibrionaceae and some other species, partly due to horizontal gene transfer of potential virulence genes (Abe *et al.*, 2020, Faruque *et al.*, 2006, Karunasagar *et al.*, 1996). Michaud *et al.* (2009) found that most of the detected potential pathogens (e.g. *Vibrio* spp., *Erwinia* spp. and *Coxiella* spp.) are associated with the biofilter biofilms in a recirculating aquaculture system (RAS) for rearing seabass. Multispecies biofilms are therefore considered as

a reservoir for potential pathogenic and antibiotic-resistant bacteria (King *et al.*, 2004). Moreover, Kotob *et al.* (2016) indicated that the relationships between microorganisms determine whether opportunistic pathogens proliferate and become virulent. Next-generation sequencing (NGS) technologies are one way to consider the importance of all species for a better understanding of the development of disease outbreaks and the fragile equilibrium within microbiomes.

Despite the development of aquaculture, most studies still mainly focus on microbiota of the reared species' organs (Larsen *et al.*, 2014). One study investigating the microbiome of the shrimp gut and tank water samples from two shrimp farms showed that microbial diversity was lower in the shrimp gut than in the tank water (Md Zoqratt *et al.*, 2018). Another recent study investigated the skin and gill microbiomes of seabass and seabream from a fish farm (Rosado *et al.*, 2019) and attested that the diversity of microbiomes was tissue-specific within and between species. Nevertheless, both studies detected potential pathogens such as *Vibrio* spp., which can lead to disease outbreaks in case of a shift in bacterial abundance (e.g. dysbiosis). Studies dealing with the microbial composition from biofilms and water in the tanks mainly involve RAS (Michaud *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2018, Wietz *et al.*, 2009), but other studies have investigated temporal variations of bacterioplankton and the seasonal dynamics of bacterial and microeukaryotic plankton communities, e.g. in a semi-intensive European seabass aquaculture system (Duarte *et al.*, 2019, Martins *et al.*, 2018). The seasonal studies showed that changes in environmental variables influence the overall microbial communities.

In this context, we conducted a seasonal survey from April to October 2018 in a seabass farm in the North of France. Every year, this farm undergoes economic losses due to vibriosis outbreaks during summer. The aim of this study was to characterize the marine fish farm microbiomes and to determine the dynamics of bacterial populations in the different compartments of the aquaculture infrastructure. The objective was particularly to understand if *Vibrio* species get into the tanks during summer through the water inlets or if they persist throughout the year as biofilms. Studying the microbial composition can help understand the recurrence of vibriosis during summer. We therefore sampled biofilms and the water from the tanks and the inlets. The

V4-V5 variable region of the 16S rRNA gene was amplified and then sequenced using an Illumina MiSeq platform. To our knowledge, this is the first study to carry out a weekly seasonal survey for 7 months on a fish farm with a comparison of microbial composition between water inlets, tank water and biofilms in the tanks.

2. Materials and methods

2.1. Sampling campaign

The experiments were conducted from April to October 2018 for 31 weeks, in Aquanord Ictus sea farm (Gravelines, France). The fish farm installation and process have been described in the year 2018 IFREMER annual report ([Antajan *et al.*, 2019](#)). Briefly, the fish farm is a flow-through system where the tanks are supplied by two water inlets. The “cold-water” inlet supplies tanks with water from the surrounding local seawater. The “hot-water” inlet supplies tanks with seawater coming from the hot-water discharge canal of a nuclear power system. Several parameters, such as temperature, salinity, conductivity, pH and dissolved oxygen, were measured in the upper surface of the water of each compartment (Table S1, available online). During the sampling campaign, no acute vibriosis outbreak occurred and fish losses remained low and stable. Fishes had been vaccinated with an autovaccine, as per annual routine, to fight against vibriosis. Fish density fluctuated from 20,000 to 30,000 individuals per breeding tank. The water capacity of each tank was 75 m³, with a water-column of 1.3 m. The tanks had a mean fish load of 48.13 kg of fish.m⁻³. Every week, 1 L of water was collected 20 cm below the water surface, in a sterilized bottle, in triplicate from the three tanks and the two water inlets. The 15 water bottles were kept on ice during the transport to the laboratory and filtered within 2 h. Nitrocellulose filters of 0.45 µm pore size (Sartorius, Goettingen, Germany) were used and then frozen at -80 °C in Luria-Bertoni (LB) broth medium supplemented with NaCl (LBS)/20% glycerol. The filtration stage has been optimized for maximum recovery of the bacterial community using a larger volume of water and larger pore size. The pore size was determined based on the high turbidity of the tank water due to suspended organic material. Moreover, to mimic the biofilm formation occurring on the walls of aquaculture tanks, we used the same concrete material to manufacture

the pieces of concrete that were immersed (20 cm below the surface of the water), collected and brought back to the laboratory. Three pieces of concrete were not immersed and were considered as blanks (hereafter named B0), whereas samples immersed 2 h in the tanks were named 0B. Every two weeks, pieces of concrete were collected in triplicate from the three same tanks as the water samples. The nine pieces of concrete, still immersed in the water, were maintained on ice during the transport and until processing at the laboratory. Each piece of concrete was swabbed on a defined surface (of 2.34 cm²) with two cotton swabs as previously done by Mougín *et al.* (2019) and swabs were stored at -80 °C in an LBS/20% glycerol medium.

2.2. DNA extraction

Filter and swab samples were thawed and vortexed for 3 min to retrieve bacteria. Filters and swabs were discarded and the samples were centrifuged at 8000 × *g* for 10 min. Supernatants were removed and 25 mL or 3 mL of physiological water were added for samples from water or biofilm, respectively. After a brief vortex, the samples were centrifuged again (8000×*g* for 10 min) and supernatants were removed. The pellets were resuspended in 2 mL of physiological water, and briefly vortexed. Samples were then centrifuged (8000 × *g* for 10 min) for the third time and the supernatants were discarded.

The DNA from each pellet was extracted using the DNeasy PowerBiofilm Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's protocol. The DNA purity was assessed on a Denovix DS-11 spectrophotometer (Clinisciences, Nanterre, France) and DNA concentration was measured using the Qubit™ dsDNA HS Assay Kit on a Qubit 3.0 fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The quantity of extracted DNA was normalized to 5 ng.µL⁻¹ in Tris HCL (10 mM, pH 8.5) for the subsequent PCR assays and stored at -20 °C. The 477 aliquots and the three negative control samples (composed of nuclease-free water) were used for metagenomic 16S rRNA gene sequencing. Hereafter samples were named tank water (W), cold-water inlet (CW), hot-water inlet (HW) and biofilm (B) samples depending on their compartment of origin. In the results, the sampling week is indicated before the compartment letter, e.g. sample named 8B came from swabbed biofilms at week 8.

2.3. PCR amplification, library preparation, 16S rRNA gene amplicon sequencing

A two-step PCR was performed according to 16S metagenomic sequencing library preparation protocol from Illumina. The first PCR step was carried out in duplicate. The amplicon primers 515F-Y/926R targeted the V4-V5 variable region of the 16S rRNA gene and were purchased from TIB MOLBIOL (Syntheselabor GmbH, Germany). The primers coupled with Illumina Reads adapters,

515F-Y 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3'
and

926R 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3'
resulted in an amplicon of around 480 bp (Parada *et al.*, 2016, Quince *et al.*, 2011). PCR reactions were carried out in a final volume of 25 μ L using 0.5 μ L of each amplicon primer (10 μ M), 2.5 μ L of DNA (5 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) and 12.5 μ L of 2X PlatinumTM Green Hot Start Master Mix (Life Technologies SAS, Thermofisher Scientific, Villepinte, France). The PCR program was as follows: 94 °C for 2 min followed by 30 cycles of a 94 °C denaturation step for 45 s, a 50 °C annealing step for 60 s and a 72 °C elongation step for 90 s (Raut *et al.*, 2018).

Dual indices were attached during the second step PCR, using the Illumina Nextera XT Index Kits v2 (Illumina, Paris, France). PCR reaction was carried out in a final volume of 50 μ L using 5 μ L of previously purified amplicon, 5 μ L of each Nextera XT Index and 25 μ L of 2X PlatinumTM Green Hot Start Master Mix. PCR program started with 94 °C for 2 min followed by 8 cycles with a denaturation step of 94 °C for 45 s, an annealing step of 59 °C for 60 s and an elongation step of 72 °C for 90 s. After each PCR step, PCR products were purified using Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, Life Sciences, Villepinte, France) and were verified using electrophoresis on a 1% agarose gel. The expected amplicon size was around 500 bp long. Final product purity was assessed with a Denovix Spectrophotometer and final product concentration was measured using the QubitTM dsDNA HS Assay Kit on a Qubit 3.0 fluorometer. The quantity of each sample was normalized to 4 nM in TrisHCL (10 mM, pH 8.5) and then 5 μ L of diluted DNA from each library were mixed.

Following the Illumina protocol, pooled library was denatured, diluted to a final concentration of 4 pM, combined with 10% PhiX (Illumina) and loaded using MiSeq reagent v3 kits (600 cycles, 2×300 bp) as recommended by the manufacturer. Finally, five sequencing runs of 96 samples each were sequenced as paired-end reads using an Illumina MiSeq platform (Illumina).

2.4. Sequence analyses

Sequences were generated in demultiplexed fastq files and analyzed using the quantitative insights into microbial ecology 2 (QIIME2; release 2019.10) open-source platform (Bolyen *et al.*, 2019, Caporaso *et al.*, 2010). In each run, a total of 47,746,767 sequences were processed using DADA2 pipeline (Callahan *et al.*, 2016, Martin, 2011). Briefly, paired-end sequences were trimmed to 240 bp, filtered, denoised, merged and chimeras were discarded, resulting in 20,134,001 dereplicated sequences (42.2%), (Table S2, available online). The DADA2 pipeline gave five amplicon sequence variant (ASV) tables, which listed the number of times each exact ASV was observed in each sample (Callahan *et al.*, 2017). The five tables were merged and technical triplicates grouped using the sum function. The combined table was filtered to exclude singletons and technical negative control samples. Taxonomy was assigned using a naive Bayes classifier trained on the 99_otus SILVA 132-release database (Altschul *et al.*, 1990, Bokulich *et al.*, 2018, Edgar, 2010, Pedregosa *et al.*, 2011, Quast *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2007). The table with taxonomic assignments was filtered a second time to exclude sequences assigned with mitochondria and chloroplast identification. Thus, analyses were subsequently performed on 159 samples, with 17,243,983 sequences clustered into 147,640 ASVs. Then, we chose a rarefaction depth of 29,725 sequences (27.41% of total retained sequences), which was the lowest read number. All samples were included in the beta-diversity analysis, without need to favor the rarest sequences. The values of the alpha-diversity indicators are detailed in Table S3 (available online). Chao1 and Shannon indices were selected to evaluate richness and evenness across sampling weeks and compartments (Chao, 1984, Shannon, 1997). Two phylogenetic measures of beta-diversity were also selected and visualized in EMPeror (Vázquez-Baeza *et al.*, 2013). The unweighted UniFrac distance was used as a qualitative measure based on the presence/absence of different considered taxa. The weighted UniFrac distance was used as a quantitative measure

based on the relative abundance of taxa (Lozupone and Knight, 2005, Lozupone *et al.*, 2011). The phylogeny pipeline was previously applied to the data using MAFFT (Kato and Standley, 2013), MASK (Lane, 1991) and FastTree (Price *et al.*, 2010) algorithms. Alpha-diversity statistical significances were tested using a Kruskal-Wallis test for pairwise comparisons (Kruskal and Wallis, 1952). Statistical significance of beta-diversity distances was analyzed using a PERMANOVA test (999 permutations).

2.5. Data availability

All sequences generated in this study are available in the NCBI sequence read archive under the Bioproject accession number PRJNA613386.

3. Results

3.1. Sequencing and classification

During the weekly sampling campaign from April to October 2018, total DNA from 477 samples from water or biofilm samples were extracted. Illumina MiSeq sequenced amplicons of the V4-V5 variable region of the 16S rRNA gene using the paired-end method and high quality sequences were obtained and processed. All technical triplicates were combined, leading to 159 samples subsequently analyzed and split into two datasets (Table S4, available online). The water dataset was composed of 110 water samples from hot- and cold-water inlets and from the three breeding tanks for 22 weeks. The second dataset was composed of 48 biofilm samples from the three breeding tanks for 16 weeks and the non-immersed blank (B0). The mean number of sequences per sample obtained in biofilm samples was 140,286 and 94,271 in water samples. The number of sequences ranged from 29,725 for the hot-water inlet sample at week 4 (4HW), to 315,298 for the biofilm sample from the second tank at week 24 (24B2). More than 17 million high quality sequences were thus processed with a mean of 108,453 sequences per sample. Each sequence was labeled, generating 147,640 ASVs. After a rarefaction process, taxonomy assignment was applied using the SILVA 132 database and the bacterial compositions were studied at different taxonomic levels.

3.2. Bacterial composition

3.2.1. Taxonomic identification

At the phylum level (Fig. 1), results attributed 94.38% of microbial diversity, all sampling dates and compartments (biofilm or water samples) combined, to six major phyla: Proteobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Planctomycetes, Chloroflexi and Thaumarchaeota. Proteobacteria and Bacteroidetes represented more than 80% of the diversity with 54.52% and 26.85%, respectively. Moreover, Gamma-, Alpha- and Deltaproteobacteria were the three main classes composing the Proteobacteria phylum with 55.88%, 37.20% and 6.82%, respectively. Secondly, because the phylum taxonomic level did not distinguish among samples, we preferred the family taxonomic level. Thus, the taxonomy of water samples was assigned based on 1,291 ASVs at the family level, whereas biofilm samples were taxonomically identified from 1,009 ASVs (Table S4, available online).

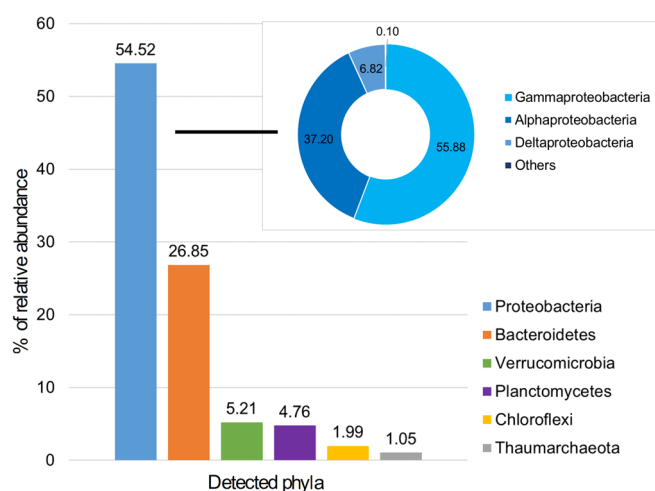


Figure 1: The six most abundant phyla (from all samples, over all sampling times), representing 94.38% of all sequences. The number above each bar indicates the percentage of each phylum. The percentage of each class of Proteobacteria is shown in the blue donut chart.

3.2.2. Composition across both datasets across time

3.2.2.1. Water dataset

The samples from the water dataset were separated into three compartments: the cold-water inlet (Fig. 2A), the hot-water inlet (Fig. 2B) and tank water samples (Fig. 3). The samples of the three tanks at the same sampling date for tank water were combined. No significant differences were observed between tanks at each week according to the pairwise comparisons of the diversity indices with the Kruskal-Wallis test. From April to October, bacterial compositions were obtained from 22 sampling weeks. The major phyla represented in water dataset were Proteobacteria, Bacteroidetes and Verrucomicrobia. Among them, Vibrionaceae, Rhodobacteraceae, Flavobacteriaceae and Rubritaleaceae were the most frequently observed families. The relative abundance of the bacterial families seemed more similar between cold- and hot- water inlets samples than with the tank water samples, particularly for Vibrionaceae. In fact, the relative abundance of Vibrionaceae barely reached 5% in either water inlet sample (Fig. 2A, 2B), whereas it reached 50% in tank water samples, with the highest abundances for 18W, 24W and 28W (Fig. 3). Inversely, the relative abundance of Rhodobacteraceae and Flavobacteriaceae accounted for around 20% of the bacterial communities for each water inlet across time, and their abundance fluctuated more drastically in tank water samples from around 20% at week 0 to barely 10% at week 30. To a lesser extent, the SAR, Halieaceae, Desulfobulbaceae, Pirellulaceae and Cyanobiaceae families were specifically detected in samples from hot- and cold-water inlets and Colwelliaceae were mostly observed in tank water samples.

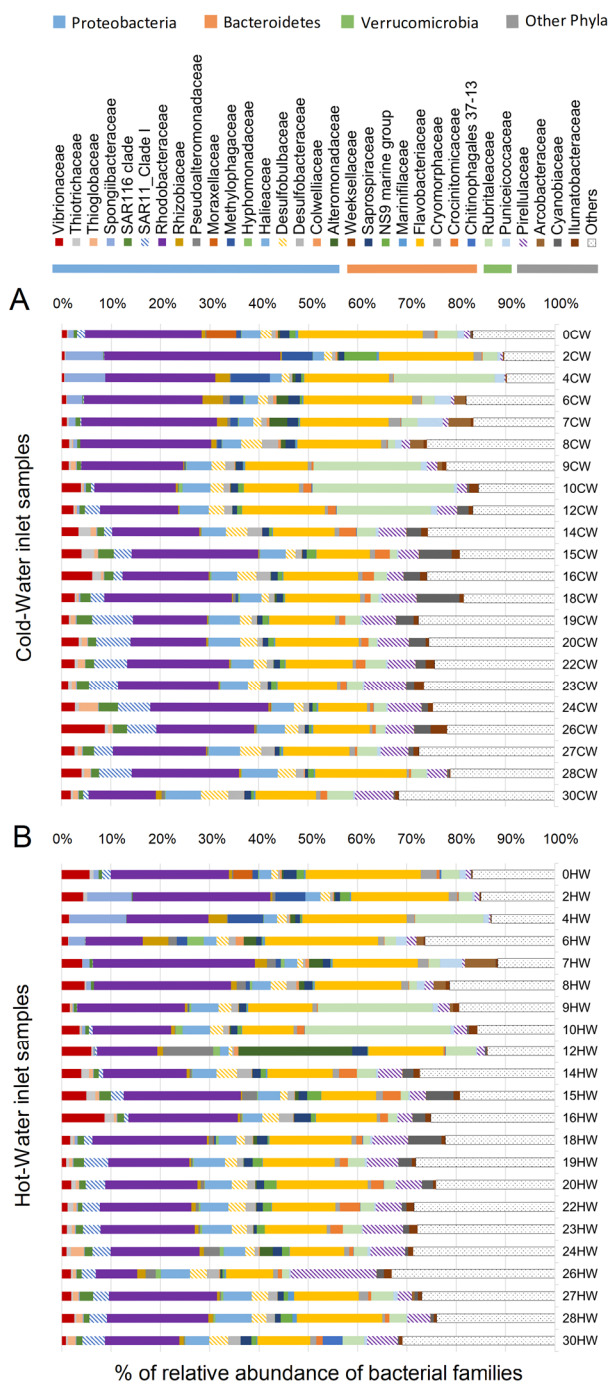


Figure 2: Bar plots of relative abundance (%) of bacterial families throughout the 30 sampling weeks composing A) the cold-water inlet samples, B) the hot-water inlet samples. Bacterial families are grouped by phylum with the second color scale on the top. Families unassigned or that did not reach a minimum of 3% in at least one sample were grouped in the “Others” category.

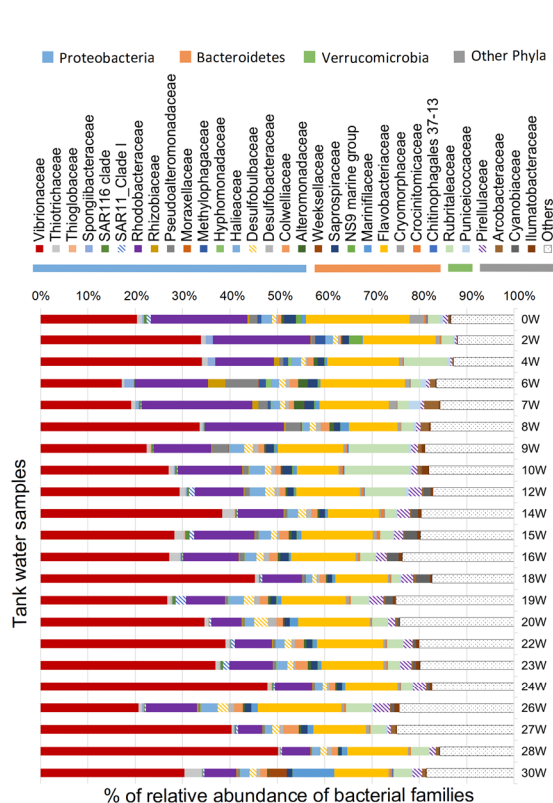


Figure 3: Bar plots of relative abundance (%) of bacterial families composing the tank water samples throughout the 30 sampling weeks. Bacterial families are grouped by phylum with the second color scale on the top. Families unassigned or that did not reach a minimum of 3% in at least one sample were grouped in the “Others” category.

3.2.2.2. Biofilm dataset

As in the tank water samples, the biofilm samples from the three tanks at the same sampling date were combined. No significant differences were observed between tanks at each week according to the pairwise comparisons of the diversity indices using the Kruskal-Wallis test. The biofilm dataset was composed of the blank samples (three non-immersed pieces of concrete, named B0) and the samples from the tanks during 16 sampling weeks (Fig. 4). The blank B0 was mostly represented by specific phyla and families that were not identified in the other samples. The Actinobacteria, Firmicutes and Cyanobacteria phyla and the Burkholderiaceae family were only detected in the B0 samples, and no Planctomycetes were identified. At week 0, after 2 h immersion, the 0B biofilm sample already harbored more Flavobacteriaceae (20.38%), Vibrionaceae (14.84%), Rhodobacteraceae (7.02%), Colwelliaceae (2.74%) and Saprospiraceae (4.30%) than the B0 sample. These relative abundances observed were quite similar to the proportions observed in 0W, i.e. in the tank water samples from the same sampling week. Proteobacteria, Bacteroidetes and Verrucomicrobia were represented in the biofilm dataset, as in the water dataset. Results also brought to light the presence of Planctomycetes, Chloroflexi and Thaumarchaeota. Among these phyla, Flavobacteriaceae, Rhodobacteraceae, Saprospiraceae, Rubritelaceae, Pirellulaceae, Vibrionaceae, Halieaceae and Rubinisphaeraceae were the most common families observed across time in biofilm samples. Three other families, Nitrosomonadaceae (from less than 0.01% in 2B to 1.71% in 30B), Nitrosopumilaceae (from less than 0.01% in 2B to 8.14% in 30B) and Nitrospiraceae (from less than 0.01% in 2B to 1.20% in 30B) were increasingly present over time at the expense of the Flavobacteriaceae (from 37.89% in 2B to 23.23% in 30B). All together, the phyla, Planctomycetes, Chloroflexi and Thaumarchaeota appeared to be specific to biofilm samples and their relative abundance increased over time.

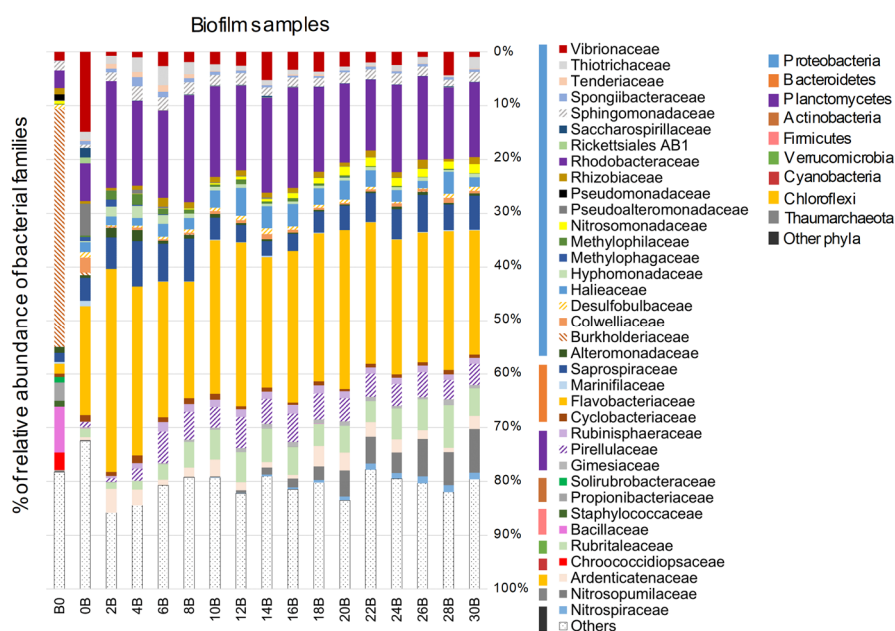


Figure 4: Bar plots of relative abundance (%) of bacterial families across biofilm samples across sampling weeks. Bacterial families are grouped by phylum and by family (color scale on the right). Unassigned families or those that did not reach a minimum of 1% in at least one sample were grouped in the “Others” category.

3.3. Analyses of alpha-and beta-diversity

3.3.1. Comparison of alpha-diversity indices

Significant differences were always observed when comparing mean values of alpha-diversity indices between datasets. The biofilm dataset had significantly the greatest diversity than the water dataset both with the richness indicator Chao1 ($H=13.87$, $p\text{-value} < 0.001$) and the richness/evenness indicator Shannon ($H=70.32$, $p\text{-value} < 0.001$).

More specifically, there were no differences in richness between the bacterial communities of tank water and biofilm samples, whereas the latter were significantly richer than samples from either water inlet ($p\text{-value} < 0.001$, Fig. 5A). The Chao1 values revealed that tank water samples harbored as many bacterial communities as biofilm samples, but both compartments had more bacterial communities than either water inlet. Shannon’s index values were significantly different between biofilm, water inlet and tank water samples ($p\text{-value} < 0.001$, Fig. 5B), this latter compartment being also significantly different from cold-water inlet samples ($p\text{-value} < 0.05$,

Fig. 5B). Hot-water inlet samples did not show differences with tank water samples or cold-water inlet samples. Shannon's index, based on richness and evenness, estimated that the microbiome was richer in biofilm samples than in other compartments, meaning that there were more bacterial communities and their presence was more evenly distributed. The bacterial communities were also richer and more evenly distributed in the tank water samples than in the cold-water inlet samples.

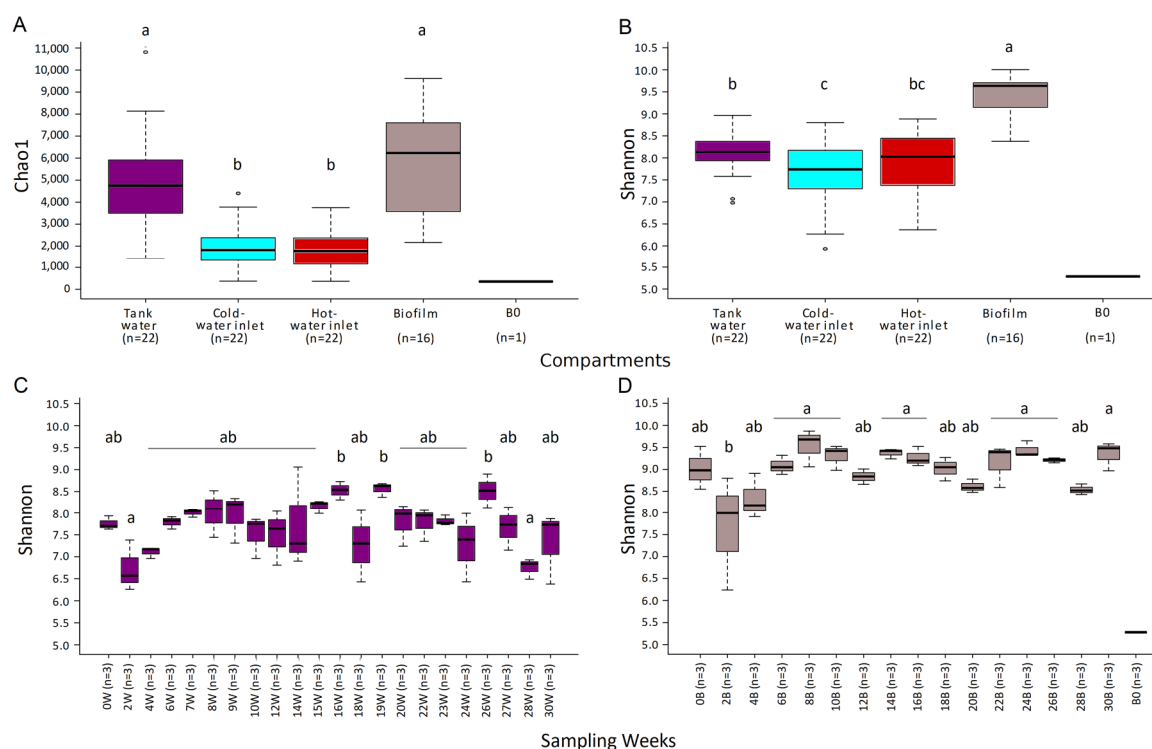


Figure 5: Mean values and standard deviations of Chao1 (A) and Shannon (B, C, D) alpha-diversity indices plotted by compartment (A, B) or by sampling week for tank water samples (C) and for biofilm samples (D). All purple and gray box plots respectively represent tank water samples and biofilm samples from the three breeding tanks. Blue and red box plots correspond to cold- and hot-water inlet samples, respectively. Kruskal-Wallis tests for pairwise comparisons were carried out and different letters indicate significant differences.

Some significant differences were observed when comparing the mean values of Shannon's index between sampling weeks within tank water samples or biofilm samples. Concerning tank water samples (Fig. 5C, p -value < 0.05), at weeks 16, 19 and 26 (16W, 19W, 26W Fig. 3), Shannon's index values showed that the bacterial communities in tank water samples were more diverse and evenly distributed than at weeks 2 and 28 (2W, 28W, Fig. 3). Regarding the biofilm samples

(Fig. 5D, p -value < 0.05), except for week 2 (2B, Fig. 4), none of the bacterial communities were significantly different regarding their richness and evenness.

Alpha-diversity results indicated that the bacterial communities were more numerous and evenly distributed within the biofilm samples than in the tank water samples. Both communities from biofilm and tank water samples were more numerous and evenly distributed than communities from either water inlet.

3.3.2. Comparison of beta-diversity

We used a principal coordinate analysis (PCoA) to compare each microbiome sample with every other sample in each dataset (water and biofilm) and each compartment (hot- and cold-water inlets, tank water and biofilm). The qualitative comparison of microbiomes (Fig. 6A) based on presence or absence of considered taxa showed that two major axes explained almost 15% of the beta-diversity of all samples. Along these axes, samples from both water inlets could be grouped together, as well as biofilm samples on one end and tank water samples on the other end. The weighted UniFrac distance greatly increased the ability to discriminate samples by compartment (Fig. 6B). Moreover, the two main axes accounted for almost 50% of the variance. PERMANOVA analyses for both beta-diversity UniFrac distances tested if the hypothesis that one compartment was different from another was correct. Thus, compartments were statistically different between another by both the unweighted ($R^2 = 0.14$, $p < 0.001$) and the weighted UniFrac ($R^2 = 0.46$, $p < 0.001$) distances.

The comparison between both UniFrac distances on the same data showed that the relative abundance of taxa in our samples was more compartment-discriminating than the presence/absence of different considered taxa, whereas presence/absence better dissociated the samples from each other.

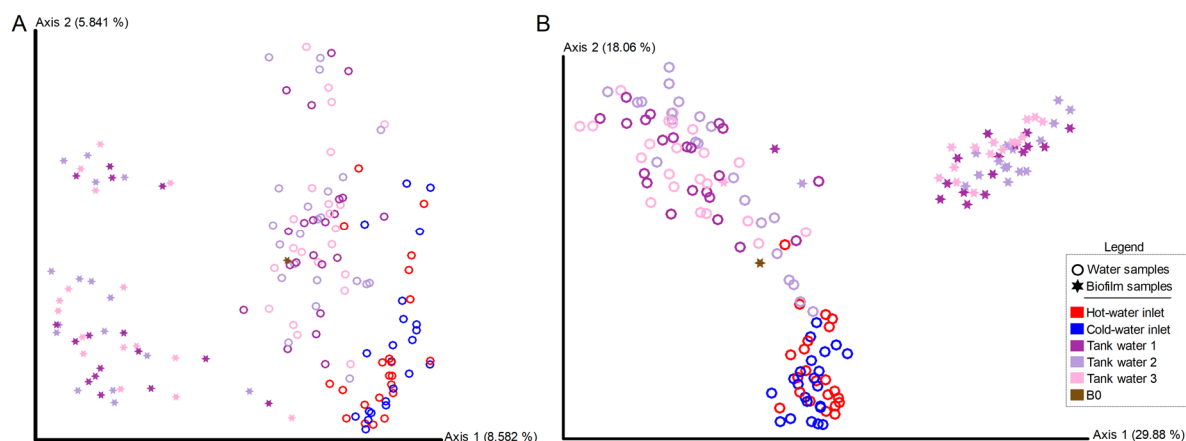


Figure 6: Beta-diversity of the 159 samples. (A) Unweighted UniFrac and (B) weighted UniFrac distances were analyzed and plotted using principal coordinates analysis (PCoA). Each point represents a microbiome sample (composed of 29,725 sequences corresponding to the rarefaction depth). Rings and stars distinguish the water dataset from the biofilm dataset, respectively. Blue and red colors correspond to cold- and hot-water inlet samples, respectively, whereas the three shades of purple indicate the water or biofilm samples from the three breeding tanks. The brown star indicates the B0 sample.

3.4. Detection and identification of the Vibrionaceae family

The study of the distribution of the Vibrionaceae family was performed on sequences identified by genus within this taxonomic level. Almost 15% of all sequences were identified as Vibrionaceae, namely 2,575,816 sequences (Table S4, available online), 90% of which (2,343,502 sequences) came from the water dataset. Six different already identified genera and two other groups defined as uncultured and unassigned were determined within the Vibrionaceae family (Table 1). *Vibrio* spp. (1,796,843 sequences), *Photobacterium* spp. (404,774 sequences), *Aliivibrio* spp. (328,413 sequences) and *Enterovibrio* spp. (29,895 sequences) were the most identified ASVs.

Table 1: Number of sequences identified, using the SILVA 132 database, in the Vibrionaceae family and number of samples

Taxonomy of Vibrionaceae detected						All samples		
Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Number of sequences	Number of samples observed	Number of total samples
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	<i>Vibrio</i>	-	1,796,843	159	159
				-	-	1,750,394	159	-
				<i>Vibrio ponticus</i>	-	24,369	68	-
				<i>Vibrio aestivus</i>	-	16,467	20	-
				<i>uncultured bacterium</i>	-	2,803	67	-
				<i>Vibrio sinaloensis</i>	-	2,436	6	-
				<i>Vibrio anguillarum</i>	-	336	28	-
				<i>uncultured Shewanella sp.</i>	-	29	10	-
				<i>uncultured Thalassotalea sp.</i>	-	9	1	-
				<i>Photobacterium</i>	-	404,774	150	159
				-	-	198,025	136	-
				<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	-	203,839	98	-
				<i>Photobacterium swingsii</i>	-	2,878	71	-
				<i>Photobacterium gaetbulicola</i> Gung47	-	14	4	-
				<i>uncultured gamma proteobacterium</i>	-	11	1	-
				<i>Photobacterium rosenbergii</i>	-	5	1	-
				<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	-	2	1	-
				<i>Aliivibrio</i>	-	328,413	130	159
				-	-	273,651	123	-
				<i>Aliivibrio fischeri</i>	-	54,762	108	-
				<i>Enterovibrio</i>	-	29,895	77	159
				-	-	29,812	74	-
				<i>Enterovibrio nigricans</i>	-	42	5	-
				<i>uncultured bacterium</i>	-	41	5	-
				<i>Salinivibrio</i>	-	55	9	159
				<i>Grimontia</i>	-	29	7	159
				<i>uncultured</i>	-	57	6	159
				-	-	15750	140	159

Moreover, Shannon's index was applied to Vibrionaceae within the tank water samples (Fig. 7). Significant differences were observed for 19W and 20W samples (both in August) compared with samples from 0W to 10W (except 6W) and from 26W to 30W. During these two weeks in August, the mean temperature was 20.5 °C (± 0.19 °C) and pH ranged from 7.24 to 7.40 (Table S1, available online).

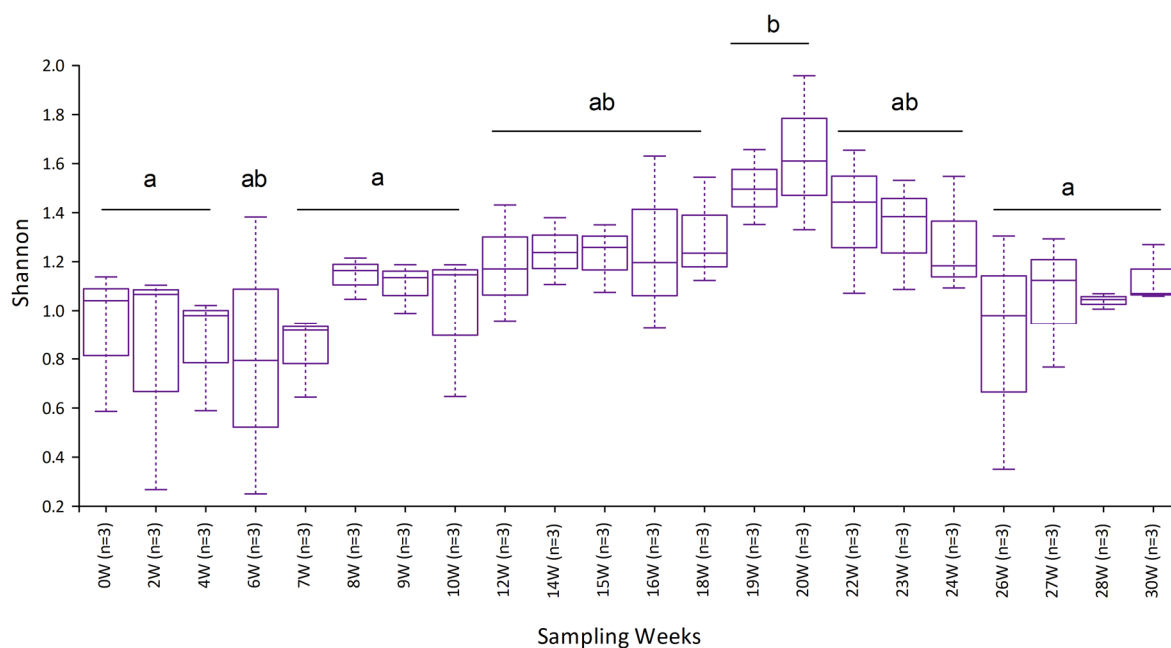


Figure 7: Mean values and standard deviations of Shannon alpha-diversity index of the Vibrionaceae family, plotted by sampling week for tank water samples. Kruskal-Wallis tests for pairwise comparisons were carried out and different letters indicate significant differences.

4. Discussion

Here, we conducted a seasonal survey in the North of France, from April to October 2018 in a seabass farm that undergoes repeated summer outbreaks of vibriosis. Although no acute vibriosis outbreak occurred during this survey, the characterization of the microbiomes from the marine aquaculture environment was of paramount importance to evaluate and monitor the bacterial communities and their potential interactions over time. Specifically, the characterization of the Vibrionaceae population dynamics in the various aquaculture compartments shed light on which compartments (water inlets, water tank and biofilm) may be a source or a reservoir of

Vibrionaceae. Using Illumina MiSeq technology targeting the V4-V5 variable region of the 16S rRNA gene, we detected and identified the bacterial communities through a weekly sampling campaign. The presence of Vibrionaceae was ubiquitous and detected in all samples (Table 1). Despite a common microbiome shared between all samples, alpha-diversity indices were significantly different between sample compartments (Fig. 5A, 5B).

4.1. Common microbiome composition

A common microbiome was detected in samples from all compartments. This commonality is likely due to the source of the water used to supply the tanks in water and in which the pieces of concrete were immersed. Taking all the results together, the Proteobacteria (54.52%) and Bacteroidetes (26.85%) phyla formed the main components of the microbiomes from the water and biofilm compartments (Fig. 1). These phyla have already been detected in a seabass farm (Duarte *et al.*, 2019) and were also predominant in the seabass skin microbiome (Chiarello *et al.*, 2015, Pimentel *et al.*, 2017, Rosado *et al.*, 2019). Moreover, Gamma-, Alphaproteobacteria and Bacteroides appear to be the first classes to form a biofilm in a RAS (Wietz *et al.*, 2009).

A core microbiome analysis (data not shown) revealed that Vibrionaceae (*Vibrio* genus, Table 1), Rhodobacteraceae (with the *Loklanella*, *Sulfitobacter*, *Planktotalea* genera), Rhizobiaceae, Flavobacteriaceae and Saprospiraceae were the families (belonging to the Proteobacteria and Bacteroidetes phyla) shared among all samples. These results were also consistent with those of Wang *et al.* (2018), who found that genera from the Saprospiraceae, Flavobacteriaceae and Rhodobacteraceae families were shared between RAS tank water and the RAS biofilter. Moreover, Flavobacteriaceae and Rhodobacteraceae have also been reported in association with zooplankton, notably because of their respective capacities to participate in the carbon cycle by degrading high-molecular-weight organic matter, and to contribute to biofilm formation (De Corte *et al.*, 2018).

4.2. Overall microbiota differences between sampling compartments

The alpha- and beta-diversity indices used in this study (Chao1, Shannon, unweighted and weighted UniFrac distances) highlighted differences in the bacterial composition between the compartments and between samples within each compartment (Fig. 5, Fig. 6). The biofilm samples and tank water samples harbored the most diverse bacterial populations compared with the water inlet samples (Fig. 5A, 5B). These observations could be partly explained by the presence of seabass in the tanks. The Colwelliaceae family was more abundant in the tank water samples than in the water inlet samples (Fig. 2, Fig. 3). Pimentel *et al.* (2017) highlighted that the accumulation of uneaten feed in the tank generate anoxic areas, where the genus *Colwellia* could be found and contribute to anaerobic processes. Otherwise, previous studies have shown that biofilm communities are distinct from other microbial communities, for example in raw water (Luo *et al.*, 2013). The increasing presence of the Nitrosomonadaceae, Nitrospiraceae and Nitrosopumilaceae families appeared to be specific to the biofilm samples (Fig. 4). In fact, these three families are involved in nitrification processes and are known as ammonium-oxidizing bacteria and ammonium-oxidizing archaea (Rurangwa and Verdegem, 2015). Luo *et al.* (2013) revealed that the presence of Firmicutes and *Nitrospiraes* spp. in microbial biofilms improves the quality of the raw water by dissolving oxygen and modifying nitrogen levels. Planctomycetes, such as Pirellulaceae (Fig. 4), also participate in ammonium oxidation in anaerobic conditions (Schreier *et al.*, 2010). The presence of these bacterial populations in a biofilm is crucial because they oxidize ammonia and nitrite into less toxic compounds, such as nitrates (Rurangwa and Verdegem, 2015).

Moreover, our results showed that bacterial populations composing biofilm established between the 2 hours immersion and the second sampling week. Bacterial communities on the non-immersed blank disappeared after just 2 h of immersion, as manifested by the Actinobacteria, Cyanobacteria and Firmicutes families. Firmicutes have been found in bacterial communities from RAS biofilters or in biofilms in raw water distribution systems (Luo *et al.*, 2013, Schreier *et al.*, 2010). These families have often been observed in various inhabited areas, such as utensils or on stones (Ng *et al.*, 2016). The populations unique to biofilms changed rapidly, despite the

presence and constancy of families common to all compartments. Our results showed that Planctomycetes, Chloroflexi and Thaumarchaeota phyla as being specific to biofilm samples.

During this seasonal campaign, the cold-water inlet underwent the most temperature changes (from 9.08 °C to 21.1 °C), due to warmer waters in the summer, but no major differences in bacterial communities were observed in this compartment. The water temperature in the tanks was maintained approximately constant by mixing in variable proportions the hot- and cold-water inlets (from 17.97 °C to 21.17 °C). Nevertheless, the bacterial communities did not change with the slightly higher temperatures during summer (Fig. 5C, 5D). Moreover, a Spearman correlation test was performed between all physical parameters (temperature, pH, oxygen, salinity and conductivity) measured in the tanks, the diversity indicators (Chao1 and Shannon from tank water and biofilm samples) and the relative abundance of Vibrionaceae (from the tank water and biofilm samples). No significant association was revealed between evenness and richness variations from the tank water and biofilm samples and temperature, oxygen, salinity or conductivity considered independently. A negative correlation was revealed only between pH and both diversity indicators in biofilm samples. Bacterial communities of biofilm samples appeared more diverse when the pH was lower. The pH variation ranged from 6.35 to 7.97 during the sampling campaign (Table S1, available online). The pH decrease may be linked to the nitrification process occurring in biofilm samples. Finally, the relative abundance of Vibrionaceae from water tank samples correlated negatively with pH and oxygen levels in the tanks, whereas the relative abundance of Vibrionaceae from biofilm samples correlated positively with the temperature in the tanks. Then the temperature rising seemed promote Vibrionaceae proliferation in biofilm samples and their role as reservoir in case of dysbiosis.

4.3. Potential pathogens detected

We then focused on the Vibrionaceae family in tank water samples, because this compartment contained more Vibrionaceae than the other compartments. Our results suggested that biofilms may be a reservoir of Vibrionaceae, and tank water seemed amenable to its proliferation. A lower Shannon index was indeed obtained (18W, 24W and 28W, Fig. 5C) when the Vibrionaceae were

most abundant (18W, 24W and 28W, Fig. 3). The balance between bacterial communities was thus disturbed, because one bacterial population had proliferated in particular. Among the Vibrionaceae family, four genera were frequent, in order of importance: *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aliivibrio* and *Enterovibrio*. More precisely, the species level determination identified *Vibrio ponticus*, *Vibrio aestivus*, *Vibrio sinaloensis* and *Vibrio anguillarum*, as well as *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *Photobacterium swingsii*, *Photobacterium gaetbulicola* Gung47, *Photobacterium rosenbergii*, and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, and *Aliivibrio fischeri* and *Enterovibrio nigricans* (Table 1). Most pathogenic *Vibrio* species, such as *Vibrio harveyi* or *Vibrio vulnificus*, were not identified, although we expected to find *V. harveyi* since it has already been identified as major pathogens in this aquaculture infrastructure (Mougin *et al.*, 2020). The Vibrionaceae population more than doubled during the sampling campaign (20% at 0W and 50% at 28W, Fig. 3). The peaks of diversity were reached at weeks 19 and 20 (during August), suggesting that all genera were present and in stable proportions (Fig. 7). Despite this variation, the equilibrium between genera remained relatively stable throughout the sampling weeks.

Our results revealed that the water from the tanks contained Vibrionaceae and may be sufficiently rich in bacteria to harbor pathogens and their antagonistic members. Some studies have indeed reported that *Roseobacter* spp. (family Rhodobacteraceae) may establish antagonistic activity against Vibrionaceae and particularly against *V. anguillarum* (Balcázar *et al.*, 2010, Hjelm *et al.*, 2004). Among the Flavobacteriaceae, *Polaribacter* is an opportunist common fish farm bacteria colonizing an already weakened fish and has already been detected in the core microbiome of seabass and seabream (Rosado *et al.*, 2019). Our results showed that increases in Rhodobacteraceae and Flavobacteriaceae were associated with decreases in Vibrionaceae. The absence of acute vibriosis outbreaks during the campaign suggests that there is an equilibrium between pathogenic Vibrionaceae and the other antagonistic bacterial communities. It would be relevant to study the putative antagonistic activity between sampled Vibrionaceae, Rhodobacteraceae and Flavobacteriaceae. Simultaneously, identification and detection of biofilm microbiomes now makes it possible to investigate the capacity of horizontal

gene transfer of the different species and to investigate antibiotic resistance. Despite the presence of potential pathogens, there were no disease outbreaks; therefore, the vaccination campaign appears to have worked. In the present study, no sampling was carried out directly on fish firstly for ethical reasons and secondly because the main objective was to consider the aquaculture compartments. Nevertheless, future studies should compare our results with fish microbiomes to confirm the efficiency of vaccination. Finally, our results demonstrated the importance of simultaneously studying all bacterial communities.

5. Conclusion

In conclusion, this is the first study to compare bacterial communities from several water compartments and from biofilms in an aquaculture farm over time with a seven-month weekly sampling campaign. Proteobacteria and Bacteroidetes, which are common phyla in water ecosystems, were abundant. The diversity of bacterial communities differed within compartments, although there were no significant correlations with water quality parameters. Biofilm samples contained higher bacterial diversity than water samples and tank water samples were richer than samples from water inlets. The proportion of Vibrionaceae was high in tank water samples. All six genera composing the Vibrionaceae family were identified. The natural environment seemed to be a source of Vibrionaceae, which found a favorable environment to develop and then persist in biofilms in the aquaculture system. In the future, we plan to investigate the antagonistic effects between Vibrionaceae and other already present bacteria to design solutions such as probiotics use to monitor bacterial populations and promote sustainable aquaculture. Moreover, the aquaculture environment can be monitored using a metatranscriptomic analysis. The bacterial populations detected can be linked to the primary and secondary metabolic functions observed, such as virulence.

Supplementary data to this article can be found online at

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735987>.

Funding

This work was supported by the French government, IFREMER and the Hauts-de-France Regional Council as part of the CPER 2018-2019 MARCO project. This work was also supported by the Hauts-de-France Regional Council and ULCO, which provided funding for Julia Mougin's PhD studies.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

Authors wish to thank Aquanord-Ictus as a contributor to this project, especially Guillaume Tielie, Anabelle Duhamel and Céline Doyen. Authors want to thank Dominique Hervio-Heath for her advice on sequencing targets. We would also like to thank the Hauts-de-France Regional Council and ULCO (PhD funding for Julia Mougin); and the CPER 2014-2020 MARCO project (post-doctoral funding for Roxane Roquigny).

References

- Abe K, Nomura N, Suzuki S. 2020. Biofilms: hot spots of horizontal gene transfer (HGT) in aquatic environments, with a focus on a new HGT mechanism. *FEMS Microbiol Ecol* 96:fiaa31.
- Ahmed N, Thompson S, Glaser M. 2019. Global aquaculture productivity, environmental sustainability, and climate change adaptability. *Environ Manage* 63:159-172.
- Ahmed W, Staley C, Sadowsky MJ, Gyawali P, Sidhu JPS, Palmer A, Beale DJ, Toze S. 2015. Toolbox Approaches Using Molecular Markers and 16S rRNA Gene Amplicon Data Sets for Identification of Fecal Pollution in Surface Water. *Appl Environ Microb* 81:7067-7077.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410.
- Antajan E, Devreker D, Loots C, Rocroy M, Alizier S. 2019. Surveillance écologique du site de production électronucléaire de Gravelines, novembre 2017 – octobre 2018. Ifremer RODE/LITTORAL/LER/BL19.02:208 p.
- Balcázar JL, Lee NM, Pintado J, Planas M. 2010. Phylogenetic characterization and in situ detection of bacterial communities associated with seahorses (*Hippocampus guttulatus*) in captivity. *Syst Appl Microbiol* 33:71-77.
- Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, Dillon M, Bolyen E, Knight R, Huttley GA, Gregory Caporaso J. 2018. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome* 6:90.
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ,

- Arumugam M, Asnicar F, Bai Y, Bisanz JE, Bittinger K, Brejnrod A, Brislawn CJ, Brown CT, Callahan BJ, Caraballo-Rodríguez AM, Chase J, Cope EK, Da Silva R, Diener C, Dorrestein PC, Douglas GM, Durall DM, Duvallet C, Edwardson CF, Ernst M, Estaki M, Fouquier J, Gauglitz JM, Gibbons SM, Gibson DL, Gonzalez A, Gorlick K, Guo J, Hillmann B, Holmes S, Holste H, Huttenhower C, Huttley GA, Janssen S, Jarmusch AK, Jiang L, Kaehler BD, Kang KB, Keefe CR, Keim P, Kelley ST, Knights D, et al. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* 37:852-857.
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J* 11:2639-2643.
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 13:581-583.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunencko T, Zaneveld J, Knight R. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7:335-336.
- Chao A. 1984. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Stat* 11:265-270.
- Chiarello M, Villéger S, Bouvier C, Bettarel Y, Bouvier T. 2015. High diversity of skin-associated bacterial communities of marine fishes is promoted by their high variability among body parts, individuals and species. *FEMS Microbiol Ecol* 91:fiv061.
- De Corte D, Srivastava A, Koski M, Garcia JAL, Takaki Y, Yokokawa T, Nunoura T, Elisabeth NH, Sintes E, Herndl GJ. 2018. Metagenomic insights into zooplankton-associated bacterial communities. *Environ Microbiol* 20:492-505.
- Duarte LN, Coelho FJRC, Cleary DFR, Bonifácio D, Martins P, Gomes NCM. 2019. Bacterial and microeukaryotic plankton communities in a semi-intensive aquaculture system of sea bass (*Dicentrarchus labrax*): A seasonal survey. *Aquaculture* 503:59-69.
- Edgar RC. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26:2460-2461.
- FAO. 2005-2020. Cultured Aquatic Species Information Programme *Dicentrarchus labrax*. Cultured Aquatic Species Fact Sheets. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Dicentrarchus_labrax/en. Accessed Updated 18 February 2005.
- Faruque SM, Biswas K, Udden SMN, Ahmad QS, Sack DA, Nair GB, Mekalanos JJ. 2006. Transmissibility of cholera: In vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *P Natl Acad Sci USA* 103:6350-6355.
- Hjelm M, Riaza A, Formoso F, Melchiorson J, Gram L. 2004. Seasonal Incidence of Autochthonous Antagonistic *Roseobacter* spp. and Vibrionaceae Strains in a Turbot Larva (*Scophthalmus maximus*) Rearing System. *Appl Environ Microb* 70:7288-7294.
- Ina-Salwany MY, Al-saari N, Mohamad A, Mursidi F-A, Mohd-Aris A, Amal MNA, Kasai H, Mino S, Sawabe T, Zamri-Saad M. 2019. Vibriosis in Fish: A Review on Disease Development and Prevention. *J Aquat Anim Health* 31:3-22.
- Karunasagar I, Ota SK, Karunasagar I. 1996. Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces. *Aquaculture* 140:241-245.
- Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol Biol Evol* 30:772-780.
- King RK, Flick GJ, Pierson D, Smith SA, Boardman GD, Coale CW. 2004. Identification of Bacterial Pathogens in Biofilms of Recirculating *Aquaculture Systems*. *J Aquat Food Prod T* 13:125-133.
- Kotob MH, Menanteau-Ledouble S, Kumar G, Abdelzaher M, El-Matbouli M. 2016. The impact of co-infections on fish: a review. *Vet Res* 47:98.
- Kruskal WH, Wallis WA. 1952. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *J Am Stat Assoc* 47:583-621.
- Lafferty KD, Harvell CD, Conrad JM, Friedman CS, Kent ML, Kuris AM, Powell EN, Rondeau D, Saksida SM. 2015. Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. *Annu Rev Mar Sci* 7:471-496.
- Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p 115-175. In E S, M G (ed), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, Chicester, NewYork.
- Larsen AM, Mohammed HH, Arias CR. 2014. Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warmwater fish species. *J Appl Microbiol* 116:1396-1404.

- Lozupone C, Knight R. 2005. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microb* 71:8228-8235.
- Lozupone C, Lladser ME, Knights D, Stombaugh J, Knight R. 2011. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *ISME J* 5:169-172.
- Luo J, Liang H, Yan L, Ma J, Yang Y, Li G. 2013. Microbial community structures in a closed raw water distribution system biofilm as revealed by 454-pyrosequencing analysis and the effect of microbial biofilm communities on raw water quality. *Bioresour Technol* 148:189-195.
- Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet Journal* 17:3.
- Martins P, Coelho FJRC, Cleary DFR, Pires ACC, Marques B, Rodrigues AM, Quintino V, Gomes NCM. 2018. Seasonal patterns of bacterioplankton composition in a semi-intensive European seabass (*Dicentrarchus labrax*) aquaculture system. *Aquaculture* 490:240-250.
- Md Zoqratt MZH, Eng WWH, Thai BT, Austin CM, Gan HM. 2018. Microbiome analysis of Pacific white shrimp gut and rearing water from Malaysia and Vietnam: implications for aquaculture research and management. *PeerJ* 6:e5826.
- Michaud L, Lo Giudice A, Troussellier M, Smedile F, Bruni V, Blancheton JP. 2009. Phylogenetic characterization of the heterotrophic bacterial communities inhabiting a marine recirculating aquaculture system. *J Appl Microbiol* 107:1935-1946.
- Mougin J, Copin S, Bojolly D, Ragueneau V, Robert-Pillot A, Quilici M-L, Midelet-Bourdin G, Grard T, Bonnin-Jusserand M. 2019. Adhesion to stainless steel surfaces and detection of viable but non cultivable cells of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* isolated from shrimps in seafood processing environments: *Stayin' alive?* *Food Control* 102:122-130.
- Mougin J, Roquigny R, Travers M-A, Grard T, Bonnin-Jusserand M, Le Bris C. 2020. Development of a mreB-targeted real-time PCR method for the quantitative detection of *Vibrio harveyi* in seawater and biofilm from aquaculture systems. *Aquaculture* 735:337.
- Ng DHP, Kumar A, Cao B. 2016. Microorganisms meet solid minerals: interactions and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biot* 100:6935-6946.
- Parada AE, Needham DM, Fuhrman JA. 2016. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ Microbiol* 18:1403-1414.
- Pedregosa F, Varoquaux G, Gramfort A, Michel V, Thirion B, Grisel O, Blondel M, Prettenhofer P, Weiss R, Dubourg V. 2011. Scikit-learn: Machine learning in Python. *J Mach Learn Res* 12:2825-2830.
- Pimentel T, Marcelino J, Ricardo F, Soares AMVM, Calado R. 2017. Bacterial communities 16S rDNA fingerprinting as a potential tracing tool for cultured seabass *Dicentrarchus labrax*. *Sci Rep UK* 7:11862.
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP. 2010. FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLOS One* 5:e9490.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41:D590-D596.
- Quince C, Lanzen A, Davenport RJ, Turnbaugh PJ. 2011. Removing Noise From Pyrosequenced Amplicons. *BMC Bioinformatics* 12:38.
- Raut S, Polley HW, Fay PA, Kang S. 2018. Bacterial community response to a preindustrial-to-future CO2 gradient is limited and soil specific in Texas Prairie grassland. *Global Change Biol* 24:5815-5827.
- Rosado D, Pérez-Losada M, Severino R, Cable J, Xavier R. 2019. Characterization of the skin and gill microbiomes of the farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*) and seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 500:57-64.
- Rurangwa E, Verdegem MCJ. 2015. Microorganisms in recirculating aquaculture systems and their management. *Rev Aquacult* 7:117-130.
- Schreier HJ, Mirzoyan N, Saito K. 2010. Microbial diversity of biological filters in recirculating aquaculture systems. *Curr Opin Biotech* 21:318-325.
- Shannon C. 1997. The mathematical theory of communication. 1963, p 306-317, *MD Comput Comput Med Pract*, vol 14.
- Thompson FL, Iida T, Swings J. 2004. Biodiversity of Vibrios. *Microbiol Mol Biol R* 68:403-431.
- Travers M-A, Basuyaux O, Le Goïc N, Huchette S, Nicolas J-L, Koken M, Paillard C. 2009. Influence of temperature and spawning effort on *Halitotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Global Change Biol* 15:1365-1376.
- Vázquez-Baeza Y, Pirrung M, Gonzalez A, Knight R. 2013. EMPeror: a tool for visualizing high-throughput microbial community data. *Gigascience* 2:2047-217X-2-16.

- Vezzulli L, Pezzati E, Brettar I, Höfle M, Pruzzo C. 2015. Effects of Global Warming on *Vibrio* Ecology. *Microbiol Spectrum* 3:VE-0004-2014.
- Wang C, Sun G, Li S, Li X, Liu Y. 2018. Intestinal microbiota of healthy and unhealthy Atlantic salmon *Salmo salar* L. in a recirculating aquaculture system. *Chin J Oceanol Limn* 36:414-426.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microb* 73:5261-5267.
- Wietz M, Hall MR, Høj L. 2009. Effects of seawater ozonation on biofilm development in aquaculture tanks. *Syst Appl Microbiol* 32:266-277.

Résumé

Les bactéries du genre *Vibrio* et plus particulièrement celles du clade Harveyi, sont responsables de la vibriose, entraînant des mortalités de masse associées à des pertes économiques considérables pour le secteur aquacole. *Vibrio harveyi* est un agent pathogène émergent pour le bar commun d'élevage (*Dicentrarchus labrax*), capable de former des biofilms. Etant donné qu'aucune méthode prophylactique n'est aujourd'hui commercialisée, la lutte contre la vibriose réside dans la prévention et le développement de méthodes de surveillance et de diagnostic. L'objectif de cette thèse consiste à apporter des éléments de compréhension, *via* la combinaison d'approches microbiologiques et moléculaires, visant à optimiser la gestion du risque *Vibrio* pour le bar commun d'élevage. Dans un premier temps, des méthodes de quantification et d'identification ont été mises au point. Une méthode de PCR en temps réel, ciblant le gène *mreB*, a été développée et optimisée pour quantifier *V. harveyi* à la fois dans l'eau et les biofilms. La « Luvibase », une base de données composée de 23 profils de spectres de masse de souches de *Vibrio* de collection a ensuite été élaborée, permettant d'identifier les espèces du clade Harveyi par MALDI-TOF MS. Dans un second temps, ces méthodes ont été appliquées lors d'une campagne hebdomadaire d'échantillonnage d'avril à octobre 2018 dans une ferme d'élevage de bars communs. Des échantillons d'eau et de biofilms ont été collectés à partir des bassins d'élevage et des arrivées d'eau chaude et froide, alimentant la ferme. L'abondance de *V. harveyi* et des Vibrionaceae cultivables à 37 °C, mais aussi leur diversité relative ont ensuite été déterminées. Plusieurs espèces potentiellement pathogènes ont régulièrement été identifiées, dont *V. harveyi*, tout au long de la campagne. L'étude de l'influence des paramètres environnementaux a mis en évidence une corrélation positive entre la température de l'eau et l'abondance de ces bactéries à la fois dans l'eau et les biofilms. Sachant que ces biofilms peuvent induire une persistance de *V. harveyi* au sein de la ferme, et que leur abondance pourrait prochainement augmenter du fait du réchauffement climatique, il est urgent de développer des solutions anti-biofilms, afin de limiter le risque *Vibrio*.

Mots clés : Aquaculture, Biofilm, *Dicentrarchus labrax*, Luvibase, MALDI-TOF MS, PCR en temps réel, *Vibrio harveyi*

Abstract

Vibrio bacteria, and particularly members of the Harveyi clade, are the causative agents of vibriosis, responsible for mass mortality events and important economic losses on aquaculture farms. *Vibrio harveyi*, which can form biofilms on aquaculture facility surfaces, has recently been identified as an emerging threat for seabass (*Dicentrarchus labrax*) aquaculture. As no prophylactic method is available on the market, it is urgent to improve surveillance and diagnosis tools to successfully manage vibriosis outbreaks. This thesis focuses on the optimisation of vibriosis risk reduction strategies in seabass farms, using a combination of microbiological and molecular approaches. First, we developed quantification and identification methods. A *mreB*-targeted SYBR Green I real-time PCR method was developed to quantify *V. harveyi* directly from environmental samples, including seawater and biofilms. A new in-house database named Luvibase, composed of 23 reference MALDI-TOF mass spectra profiles from *Vibrio* collection strains, was elaborated in order to identify *Vibrio* species belonging to the Harveyi clade, by MALDI-TOF MS. Second, those methods were applied during a sampling campaign from April to October 2018 in a seabass aquaculture facility. Seawater and biofilm samples were collected from rearing tanks, and from the cold- and hot-water inlets, supplying the farm. The abundance of *V. harveyi* and Vibrionaceae cultivable at 37 °C and their relative diversity were then determined. Several pathogens for seabass were constantly isolated during the sampling campaign. A positive correlation was highlighted between seawater temperature and their abundances in both types of samples. As these biofilms may act as a reservoir of *V. harveyi* in the farm, and as its abundance is likely to increase due to global warming, anti-biofilm solutions are urgently needed, in order to manage the risk of *Vibrio* outbreak.

Keywords : Aquaculture, Biofilm, *Dicentrarchus labrax*, Luvibase, MALDI-TOF MS, Real-time PCR, *Vibrio harveyi*