

Université de Montréal

INVESTIGATION BACTÉRIOLOGIQUE SUR
LES MORTALITÉS MASSIVES ET SAISONNIÈRES
CHEZ LE PÉTONCLE GÉANT *PLACOPECTEN MAGELLANICUS*

par

STÉFANIE CARDIN

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

Décembre, 2005

©Stéfanie Cardin, 2005



SF
607
US4
2506
V.017

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

ce mémoire intitulé

INVESTIGATION BACTÉRIOLOGIQUE SUR
LES MORTALITÉS MASSIVES ET SAISONNIÈRES
CHEZ LE PÉTONCLE GÉANT *PLACOPECTEN MAGELLANICUS*

présenté par
STÉFANIE CARDIN

a été évalué par le jury composé des personnes suivantes

Ann Letellier, président-rapporteur

Serge Messier, directeur de recherche

F. Carl Umland, codirecteur

Madeleine Fortin, membre du jury

Résumé

Pour déterminer la cause bactérienne des mortalités massives et saisonnières du pétoncle géant *Placopecten magellanicus* enregistrées en Basse Côte-Nord, 50 pétoncles sains des Îles de la Madeleine, 20 pétoncles sains et 20 pétoncles moribonds de la Basse Côte-Nord furent échantillonnés au niveau des branchies, de la glande digestive, du muscle et du broyat formé de ces trois organes. Les bactéries récupérées ont été identifiées par des tests biochimiques, par séquençage d'ARNr 16S et par chromatographie en phase gazeuse. Suite à la comparaison des médianes avec le test de Cochran-Mantel-Haenszel des types bactériens retrouvés chez les pétoncles moribonds de la Basse Côte-Nord (*Vibrio*, *Shewanella*, *Pseudoalteromonas* / *Pseudomonas* / *Alteromonas*, *Psychrobacter*, *Colwellia*, bactérie marine, *Flavobacterium* et *Psychromonas*) et ceux retrouvés chez les pétoncles sains de la Basse Côte-Nord (*Vibrio*, *Pseudoalteromonas* / *Pseudomonas* / *Alteromonas*, *Psychrobacter*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Colwellia* et bactérie marine), aucune différence statistiquement significative n'a pu être établie ($P > 0,05$). L'état du système immunitaire des pétoncles fut aussi évalué chez 45 pétoncles de la Basse Côte-Nord et 45 pétoncles de la Nouvelle-Écosse avec les tests de phagocytose de microbilles de latex fluorescentes en microplaque. Après la comparaison des pourcentages de phagocytose, nous avons pu établir que de façon générale la phagocytose était plus élevée chez les pétoncles de la Basse Côte-Nord ($P < 0,0001$) et que le pourcentage de phagocytose était significativement moins élevé en septembre qu'en août et en octobre ($P < 0,0001$), mais qu'il n'y avait pas de différence significative entre les mois d'août et d'octobre ($P = 0,11$).

Mots-clef : Mortalité massive, pétoncle, *Placopecten magellanicus*, flore bactérienne, phagocytose.

Summary

To determine the bacterial cause of the mass mortalities of the sea scallop *Placopecten magellanicus* recorded in the Lower North Shore, the gills, digestive gland, muscle and homogenate were obtained from 50 scallops from Iles de la Madeleine, and 20 healthy scallops and 20 moribund scallops from Lower North Shore. Identification of the isolated bacteria was undertaken via biochemical tests, 16S RNAr sequencing and gas chromatography. Following the median comparison with the Cochran-Mantel-Haenszel test of the bacterial types found in the moribund scallops (*Vibrio*, *Shewanella*, *Pseudoalteromonas* / *Pseudomonas* / *Alteromonas*, *Psychrobacter*, *Colwellia*, marine bacteria, *Flavobacterium* and *Psychromonas*) and those found in the healthy scallops from Lower North Shore (*Vibrio*, *Pseudoalteromonas* / *Pseudomonas* / *Alteromonas*, *Psychrobacter*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Colwellia* and marine bacteria), no significant statistical difference was established between flora of healthy and moribund scallops from the Lower North Shore ($P > 0,05$). Evaluation of the immune system of the scallops was also undertaken. Phagocytic activity from 45 scallops from Lower North Shore and 45 scallops from Nova Scotia was evaluated using fluorescent latex microbeads in a microplate. After comparison of the phagocytosis percentages, it was established that the phagocytosis was in general significantly higher in scallops from the Lower North Shore than in Nova Scotia ($P < 0,0001$) and significantly lower in September than in August and October ($P < 0,0001$). There was no difference between the months of August and October ($P = 0,11$).

Keywords : Mass mortality, scallop, *Placopecten magellanicus*, bacterial flora, phagocytosis.

Table des matières

<i>Identification du jury</i>	<i>iii</i>
<i>Résumé</i>	<i>iv</i>
<i>Summary</i>	<i>v</i>
<i>Table des matières</i>	<i>vi</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>iii</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>ix</i>
<i>Liste des sigles et abréviations</i>	<i>x</i>
<i>Remerciements</i>	<i>xi</i>
<i>Introduction</i>	<i>1</i>
<i>Recension de la littérature</i>	<i>3</i>
Description de l'espèce <i>Placopecten magellanicus</i>	3
Généralités	3
Alimentation	3
Cycle biologique	4
Croissance	4
Mortalité	4
Contamination et intoxication	5
Système immunitaire des bivalves	5
Les différentes méthodes préalablement utilisées pour récupérer et identifier les microflores des mollusques	8
Dissection, récupération et isolement	8
Tests bactériologiques pour l'identification de la microflore	13
Autres outils de diagnostic	16
Microflore des mollusques	19
Description des genres susceptibles d'être rencontrés chez les mollusques et les tests permettant leur distinction	20
Les genres	20
Tests permettant la distinction des genres	33
Maladies déjà connues affectant les mollusques	35
Maladies au Canada et d'intérêt régional	35
Maladies à signification négligeable au Canada	37
Aspect de la maladie affectant le Pétoncle géant de la Basse Côte-Nord	39
<i>Article 1</i>	40
<i>Discussion générale</i>	60
<i>Conclusions</i>	67
<i>Bibliographie</i>	69
<i>Annexe 1 : Clef taxonomique pour l'identification des bâtonnets à Gram négatif mobiles</i>	<i>xiii</i>

<i>Annexe 2 : Clef taxonomique pour l'identification des bâtonnets à Gram négatif non-mobiles</i>	<i>xiv</i>
<i>Annexe 3 : Clef d'identification préliminaire des Vibrionaceae</i>	<i>xv</i>
<i>Annexe 4 : Clef d'identification rapide pour les bâtonnets à Gram négatif</i>	<i>xvi</i>
<i>Annexe 5 : Clef d'identification basée sur les résultats des tests d'arginine dihydrolase, ornithine et lysine décarboxylases</i>	<i>xvii</i>
<i>Annexe 6 : Clef d'identification basée sur les résultats des tests d'arginine dihydrolase, ornithine et lysine décarboxylases</i>	<i>xviii</i>
<i>Annexe 7 : Clef d'identification basée sur les résultats des tests d'arginine dihydrolase, ornithine et lysine décarboxylases</i>	<i>xix</i>
<i>Annexe 8 : Clef d'identification basée sur les résultats des tests d'arginine dihydrolase, ornithine et lysine décarboxylases</i>	<i>xx</i>
<i>Annexe 9 : Clef d'identification basée sur les résultats des tests d'arginine dihydrolase, ornithine et lysine décarboxylases</i>	<i>xxi</i>
<i>Annexe 10 : Clef d'identification des bactéries à Gram positif provenant de l'eau</i>	<i>xxii</i>
<i>Annexe 11 : Clef d'identification des bactéries à Gram négatif provenant de l'eau</i>	<i>xxiii</i>
<i>Annexe 12 : Protocole de récupération et d'identification de la flore bactérienne du pétoncle géant <i>Placopecten magellanicus</i></i>	<i>xxiv</i>
<i>Annexe 13 : Clef d'identification pour l'identification de la flore du pétoncle géant <i>Placopecten magellanicus</i></i>	<i>xxvi</i>
<i>Annexe 14 : Clef d'identification pour les bactéries aérobies ou anaérobies facultatives à Gram négatifs, non-fermentaires et oxydase positive du pétoncle géant <i>Placopecten magellanicus</i></i>	<i>xxvii</i>

Liste des tableaux

Revue de la littérature

Tableau I : Composants du système immunitaire des bivalves _____ 5

Article 1

Table I : Relative frequency of the bacterial types found in the moribund and healthy scallops of the Lower North Shore _____ 54

Liste des figures

Revue de la littérature

- Figure 1 : Différentes parties de la chromatographie en phase gazeuse _____ 17
- Figure 2. *Patinopecten yessoensis* (coquille supérieure retirée) démontrant des signes typiques de la Maladie bactérienne intracellulaire _____ 36

Article 1

- Figure 1 : Comparaison of the medians of the genera found in the moribund and healthy juvenile sea scallops of the Lower North Shore _____ 54
- Figure 2 : Comparison of phagocytic capacities of scallops from the Lower North Shore and Nova Scotia for August, September and October _____ 55

Liste des sigles et abréviations

ADH : Arginine dihydrolase

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism

AnO₂BA : Gélose sang anaérobie (Anaerobic Blood Agar)

API : Analytical Profile Index

ARN : Acide ribonucléique

ATCC : American Type Culture Collection

BA : Gélose sang (Blood Agar)

BrA : Gélose Brucella (Brucella Agar)

BHI : Gélose cœur-cervelle (Brain-Heart Infusion)

BHIA : Gélose cœur-cervelle (Brain-Heart Infusion Agar)

BTB-teepol : Gélose sélective pour *Vibrio parahaemolyticus* contenant du teepol

CA : Gélose Columbia (Columbia Agar)

CMBA : Gélose sang commerciale (Commercial Blood Agar)

EG : Gélose Éthylène Glycol (Ethylene Glycol agar)

GSP : Gélose glutamate- amidon- rouge phénol (Glutamate Starch Phenol Red agar)

LDC: Lysine décarboxylase

MA : Gélose marine (Marine Agar)

MAC : Gélose MacConkey (MacConkey agar)

MAGPC : Gélose sélective pour bactérie marine anaérobie à Gram positif

MB : Bouillon marin (marine Broth)

MSA-B : Gélose sel marin

NB : Bouillon nutritif (Nutrient Broth)

ODC : Ornithine décarboxylase

PCR : Amplification en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction)

PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis

PY-G : Gélose d'extrait de levure peptoné avec glucose (Peptone- Yeast extract with
Glucose agar)

RAPD : Random Amplification of Polymorphic DNA

Rep-PCR : Repetitive extragenic palindromic-PCR

SA : Gélose Schaedler (Schaedler Agar)

SWA : Gélose d'eau de mer (Sea Water Agar)

TCBS : Gélose Thiosulfate-Citrate-Bile-Sels-Sucrose (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar)

TSA : Gélose trypticase soya (Trypticase Soya Agar)

TSAg : Gélose trypticase soya avec glucose (Trypticase Soya Agar with glucose)

TSB : Bouillon trypticase soya (Trypticase Soya Broth)

TSBg : Bouillon trypticase soya avec glucose (Trypticase Soya Broth with glucose)

TSI : Milieu triple sucre et fer (Triple Sugar Iron)

Remerciements

Je tiens à remercier tous ceux et celles qui ont collaboré de près comme de loin à l'étude de mon projet de recherche.

Je voudrais d'abord remercier les Drs Serge Messier et F. Carl Umland pour leurs judicieux conseils et leur généreuse contribution tout au long de mon projet de maîtrise. Également, je remercie le Dre Madeleine Fortin pour avoir collaboré au projet et fourni des recommandations très utiles.

Aussi, je tiens à souligner la participation du Dr Pierre Hélie au comité conseil et à son support d'ordre général.

Je souhaite mentionner la généreuse et précieuse aide technique fournie par Sophie Gauthier-Clerc et Marlène Fortier de l'INRS-IAF et du personnel des laboratoires de bactériologie du MAPAQ et de la Faculté de médecine vétérinaire.

Je tiens à remercier le Dr Guy Beauchamp pour sa très grande contribution aux analyses statistiques, à Valérie Girard, Micheline Nault et Donald Tremblay pour leur aide durant le présent projet et au Dr Michel Fournier pour m'avoir donné accès à ses installations.

Finalement, merci au RAQ et au Ministère de l'Agriculture, Pêcheries et Agriculture du Québec qui ont permis la réalisation du projet grâce à leur aide financière, et à la Faculté des études supérieures pour la bourse de rédaction qu'elle m'a octroyée.

Introduction

Au cours des dernières décennies, l'aquaculture s'est développée de façon fulgurante et ce au niveau mondial. Cette industrie représente une activité économique de plusieurs millions de dollars pour certains pays comme le Canada, le Japon, la Chine, le Chili et le Pérou. L'aquaculture pourrait devenir une solution intéressante pour certaines régions côtières où l'on observe un épuisement de certaines espèces déjà commercialisées et une grande diminution des pêcheries et des populations par la diversification des espèces exploitées. Pour certaines espèces de mollusque telle que la moule, l'implantation des exploitations semble bien se dérouler même si certains aspects restent à être étudiés pour améliorer le rendement. Pour d'autres espèces telle que le pétoncle géant *Placopecten magellanicus*, le processus semble plus difficile dans certaines régions malgré un grand potentiel de développement.

Depuis 1993, des épisodes de mortalités massives et saisonnières du pétoncle géant *P. magellanicus* sont enregistrés dans la région de la Basse Côte-Nord de la province du Québec. Des examens histologiques faits alors n'ont pas permis d'établir la cause du phénomène. Le groupe de recherche Papatshe Inc. fût créé avec la mission de déterminer l'étiologie des mortalités. On effectua des tests de provocation des mortalités à l'aide d'homogénats de tissus de pétoncles moribonds et sains ainsi que des examens virologiques et histologiques. Le Papatshe Inc. a conclu que les pétoncles de la Basse Côte-Nord sont plus susceptibles aux stress que ceux des autres régions étudiées et sont porteurs d'un agent pathogène qui serait d'origine bactérienne. Cet agent infectieux ne peut être identifié par les méthodes conventionnelles d'histologie et pour déterminer et caractériser l'agent pathogène, d'autres techniques devraient être employées et l'identification de la flore bactérienne serait nécessaire.

Plusieurs maladies sont connues pour affecter les mollusques telles que la nécrose bacillaire et l'abcès bactérien (Bower, 1998; Bower, 2004; Bower, 1994a; Bower, 1994b; Bower, 1994c; Bower, 1997), mais les cas de mortalités qui nous intéressent ne présentent aucun des symptômes caractéristiques des maladies déjà répertoriées.

Le but du présent projet est d'identifier l'agent causal d'origine bactérienne des mortalités massives et saisonnières du pétoncle géant *P. magellanicus* enregistrées en Basse Côte-Nord. Les objectifs étaient d'identifier les flores bactériennes de pétoncles sains et moribonds à l'aide de tests biochimiques, de PCR, de séquençages d'ARNr 16S et par chromatographie en phase gazeuse pour ensuite les comparer afin de déterminer la présence d'un agent pathogène. Nous voulions aussi évaluer l'état du système immunitaire du pétoncle géant de la Basse Côte-Nord en comparant sa capacité à phagocyter des microbilles de latex fluorescentes via une technique en microplaque à celle du pétoncle géant de la Nouvelle-Écosse, puisqu'il est de la même lignée génétique, où aucun cas de mortalité massive n'a été rapporté.

Recension de la littérature

Description de l'espèce Placopecten magellanicus

(Lamoureux, 1985; MAPAQ, 2005)

Généralités

Placopecten magellanicus est un mollusque bivalve à coquille calcaire et à branchies en lamelles couvertes de cils vibratils, qui est aussi connu sous l'appellation de Pétoncle géant. On retrouve ce mollusque dans le nord ouest de l'Atlantique, de la côte nord du Saint-Laurent, jusqu'à la Caroline du Nord. Le pétoncle vit sur les fonds et en eau froide à des températures allant de 5°C à 15°C. Il ne survivra pas à des températures supérieures à 21°C, mais il pourra supporter des températures plus froides (jusqu'à -1°C) durant plusieurs mois. L'élevage du pétoncle est pratiqué depuis longtemps au Japon, mais ce n'est que récemment que cette technique a fait son entrée au Canada Atlantique. Certains pêcheurs, après avoir observé une diminution de leurs captures de pétoncles, ont pris l'initiative d'en faire la culture à des fins d'ensemencement des fonds. Des essais de production de larves en éclosérie ont été effectués avec succès. L'élevage du pétoncle est, en de nombreux points, similaire à l'élevage des moules avec comme exception que les larves de pétoncles sont beaucoup plus fragiles et ne se fixent que temporairement. On doit donc élever les pétoncles dans des paniers, ce qui demande beaucoup plus d'équipements et de soins.

Alimentation

Le pétoncle géant est un filtreur, i.e. qu'il filtre l'eau pour se nourrir de plancton et de certains déchets organiques. Il est aussi un suspensivore et un microphage car il se nourrit de petites particules en suspension. En milieu artificiel, comme dans une éclosérie, on devra l'alimenter d'un mélange de plusieurs espèces de phytoplancton.

Cycle biologique

Comme la moule, le pétoncle est dioïque, i.e. qu'il ne possède qu'un des deux sexes, il a des glandes génitales de couleur rouge corail s'il est une femelle et crème s'il est un mâle. De plus, la fertilisation est externe. Au moment de la reproduction, les pétoncles libèrent leurs produits sexuels dans l'eau et les gamètes mâles et femelles se rencontrent au hasard des courants. Une femelle pétoncle mature peut relâcher jusqu'à 100 millions d'œufs, mais seulement une faible proportion de ceux-ci atteindront la maturité. La reproduction a lieu de l'été à l'automne, stimulée par une baisse de la température de l'eau. En Gaspésie et aux Îles de la Madeleine, la ponte a lieu de la mi-août à la mi-septembre. Suite à la fertilisation externe des gamètes, les larves se déplacent avec les courants pendant 4 à 6 semaines, à la recherche d'un substrat sur lequel elles se fixent temporairement durant quelques mois jusqu'à un an. Après cette période, le pétoncle juvénile est capable de nager grâce à des mouvements rapides de sa coquille. Il ira se déposer sur les fonds et se déplacera à sa guise s'il est dérangé par des prédateurs.

Croissance

La croissance des pétoncles dépend de la température de l'eau et de l'apport nutritionnel de l'eau. Une croissance optimale a lieu à une température de l'eau d'environ 10°C. En général, les pétoncles ont besoin de 4 à 5 ans pour atteindre la taille commerciale minimale de 95 mm.

Mortalité

Comme la moule, le pétoncle ne peut pas vivre au-delà d'une certaine limite de tolérance physiologique conditionnée par les facteurs environnementaux tels que la température de l'eau, la salinité et l'apport en nourriture. Une température de l'eau supérieure à une vingtaine de degrés est reconnue pour être létale chez le pétoncle géant. Les pétoncles peuvent également être victimes de certaines maladies ainsi que des prédateurs et des parasites.

Contamination et intoxication

Comme les autres mollusques, le pétoncle géant accumule très facilement les toxines produites par certaines algues ou plantes microscopiques qui sont responsables de l'intoxication paralysante chez les mollusques. Le muscle n'est quant à lui pas contaminé. Les pétoncles peuvent donc être vendus pour leurs muscles qui, après avoir été décoquillés, peuvent être consommés sans inquiétude. Par contre, les autres parties comme le manteau et le corail sont alors toxiques. Si le pétoncle entier et vivant est destiné à la vente (pétoncle « princesse »), un suivi de la présence des toxines dans l'eau et chez l'animal est essentiel. De plus, la contamination par des déchets industriels peut engendrer un stress chez le pétoncle qui diminuerait sa tolérance envers d'autres sources de stress telles que les infections et ainsi, pourrait augmenter le taux de mortalité (Blaise, 2002).

Système immunitaire des bivalves

(Canesi, 2002)

Les mollusques possèdent une immunité innée constituée de barrières physicochimiques (coquille, mucus) qui font obstacle aux invasions externes. La deuxième ligne de défense, l'immunité acquise, implique les composants de l'hémolymphe (hémocytes et facteurs solubles) qui sont capables de déclencher une grande variété de mécanismes de défense (tableau 1).

Tableau I. Composants du système immunitaire des bivalves

Immunité inné : barrières physiques (coquille et mucus)		
	humorale (serum) →	lectines solubles enzymes hydrolytiques peptides antimicrobiens
Immunité acquise :	cellulaire →	hémocytes granulaires et agranulaires
		{ <ul style="list-style-type: none"> chimiokinésisme chimiotactisme adhésion et internalisation activation du «oxidative burst» enzymes lysosomaux peptides antimicrobiens }

La phagocytose est la principale voie d'élimination des bactéries. Elle est exécutée par des phagocytes professionnels et implique la reconnaissance, l'attachement et l'internalisation des organismes pathogènes. La phagocytose est essentielle dans le processus de défense contre les corps étrangers chez les vertébrés et est accomplie par les leukocytes polymorphonucléaire, monocytes et les macrophages tissulaires, alors que chez les mollusques, celle-ci est exécutée par les hémocytes. De plus, la variabilité de la sensibilité des bactéries à être éliminées par l'hémolymphe chez les différentes espèces d'invertébrés suggèrent que le rôle des interactions de surface entre les bactéries et les composants de l'hémolymphe est crucial dans la détermination de la finalité des microorganismes envahissant les tissus.

Les bivalves possèdent les deux types de mécanismes de défense, soit humoral et cellulaire, qui sont d'une efficacité remarquable. La partie humorale est formée du plasma (ou du sérum de l'hémolymphe) qui contient une variété de protéines incluant les lectines solubles, les enzymes hydrolytiques et les peptides antimicrobiens. Les cellules circulantes sont habituellement nommées hémocytes. De tous les types d'hémocytes, ce sont ceux dits granulés que l'on retrouve en plus grand nombre et les principales variables les distinguant entre eux sont le nombre et type de granules et le degré d'activité phagocytaire. Les hémocytes des bivalves ressemblent aux monocytes et macrophages des vertébrés au niveau de leur structure et de leur fonction. Il a été démontré qu'ils produisent des métabolites toxiques tels que des intermédiaires oxygénés réactifs et de l'oxide nitrique et possèdent plusieurs enzymes lysosomaux. Les hémocytes des bivalves sont des cellules mobiles qui possèdent un grand potentiel d'aggrégation et qui ont démontré, dans certains cas, un chimiotactisme vers des agents pathogènes ou leurs produits dépendamment de la nature des molécules présentées. Parce que le chimiotactisme et le chimiokinésisme augmentent les probabilités de contact physique entre les hémocytes et les envahisseurs, les peptides méthylés pourraient servir de signal universel pour l'activation des hémocytes lors d'une infection bactérienne. Les hémocytes circulants sont clairement la première réponse dans la défense contre les parasites et les agents pathogènes. L'élimination des microbes résulte de l'action combinée du processus phagocytaire et des facteurs humoraux de défense tels

que les agglutinines, les enzymes lysosomales, les intermédiaires oxygénés toxiques et une variété de peptides antimicrobiens.

L'activité cytotoxique des hémocytes d'invertébrés nécessite un contact rapproché avec la cellule cible. Ce premier niveau de reconnaissance du non-soi avec l'élimination du corps étranger est présent chez tous les invertébrés par le processus de phagocytose. L'adhésion de la bactérie à la membrane du phagocyte ne repose pas seulement sur les forces physiques (interactions covalentes et hydrophobes), mais peut également être facilitée par certaines molécules. Le sérum des invertébrés ne possède pas d'immunoglobulines et doit utiliser d'autres types de molécules dans le processus de reconnaissance du non-soi nécessaire à l'immunité. Parmi les molécules qui pourraient remplir ce rôle on retrouve les lectines qui réagissent de façon spécifique avec les hydrates de carbone des glycoprotéines et des glycolipides et qui induisent l'agglutination ou l'opsonisation des corps étrangers (Monroy, 1992; Olafsen, 1995; Renwranz, 1983). Les lectines sont impliquées dans les interactions cellule à cellule incluant les adhésions hôte-agent pathogène, les infections virales et l'adhésion bactérienne. Les lectines des bivalves diffèrent des autres lectines répertoriées au niveau de leur taille moléculaire ou de leur structure des sous-unités, de leurs propriétés agglutinantes et / ou de leur liaison spécifique aux sucres. Le rôle des lectines pourrait ressembler en partie à celui des anticorps dans la reconnaissance du non-soi (Monroy, 1992) en considérant que cela nécessiterait une grande quantité de lectines en circulation, chacune avec une spécificité différente de liaison à l'hydrate de carbone et un degré de régulation qui pourrait être supérieur à ce qui est normalement observé chez les lectines (Olafsen, 1995). Chez les bivalves, les lectines sont impliquées dans la reconnaissance cellulaire et sont impliquées dans l'opsonisation lors de la phagocytose. Il existe une grande variabilité entre les isolats d'une même espèce bactérienne et entre les espèces de bivalves quant au rôle et à l'efficacité des lectines. Certaines lectines se lieraient à la surface des bactéries et provoqueraient l'agglutination de celles-ci; ainsi, la phagocytose serait améliorée par l'immobilisation des bactéries envahissantes. Une autre possibilité serait que les lectines agglutinantes et non-agglutinantes formeraient un pont moléculaire entre la surface des bactéries et des hémocytes ce qui faciliterait la phagocytose (opsonisation). Finalement, dans certains cas il a été démontré que les

lectines n'étaient pas impliquées dans l'agglutination et n'étaient pas nécessaires à l'association et à la phagocytose.

Après la reconnaissance du non-soi et à son adhésion à la membrane de l'hémocyte via les forces physiques et les interactions ligand-récepteur, la membrane de l'hémocyte s'invagine au site de liaison du corps étranger pour permettre l'endocytose de la bactérie dans le phagosome primaire. Les événements suivants dépendent de l'activité des granules lysosomales qui se dirigent vers le phagosome pour fusionner avec sa membrane et former le phagosome secondaire et y relâcher leur contenu dans la vacuole. Ceci initie l'élimination intracellulaire et la digestion de la bactérie. Les facteurs qui influencent la phagocytose sont à ce jour inconnus. Il a été suggéré que la température pourrait avoir un effet sur celle-ci. *In vitro*, la phagocytose a été inhibée à basse température (0-5°C) et à température élevée (37-50°C), tandis que le processus s'effectue de façon efficace à des températures situées entre 10-37°C en conditions aérobies et anaérobies (Prieur, 1990). Les températures environnementales et autres facteurs saisonniers, tels que la salinité, la nutrition et la gamétogenèse, pourraient influencer l'habilité des hémocytes à détruire les bactéries.

Les différentes méthodes préalablement utilisées pour récupérer et identifier les microflores des mollusques

Dissection, récupération et isolement

L'étude de la microflore bactérienne des mollusques exige, au départ, des connaissances sur la façon de récupérer ces bactéries et les conditions de culture sont à utiliser. Les bactéries marines sont définies comme étant des bactéries provenant de la mer et qui nécessitent pour croître un milieu contenant de l'eau de mer comme diluant lors de l'isolement initial (ZoBell et Upham, 1944). Contrairement à la croyance populaire, l'addition de 3% de NaCl dans les milieux pour bactéries «terrestres» ne rend pas ces derniers convenables pour la culture de plusieurs bactéries marines (Baumann et Baumann, 1992). Celles qui, en plus, sont capables de croître sur milieu à base d'eau

distillée, sont considérées comme des contaminants terrestres. Or, puisque les pétoncles qui nous intéressent sont élevés dans un estuaire, nous devons nous attendre à obtenir autant des bactéries dites terrestres que marines. Plusieurs techniques ont été utilisées pour la récupération et la culture des bactéries.

Colwell et Liston (1962) ont récupéré des bactéries à partir d'échantillons prélevés de mollusques à l'aide de coton-tige stérile et mis dans des tubes vissés contenant 1-2 mL d'eau de mer vieillie additionnée de 0,5% de peptone. Ensuite, du liquide provenant des tubes a été strié sur milieux gélosés contenant 0,5% d'extrait de levure, 0,8% de bouillon nutritif (NB) et de l'eau de mer vieillie et les géloses ont été incubées cinq jours à 20°C et 25 jours à 0°C. Les colonies sélectionnées ont ensuite été repiquées dans des tubes de NB faits à partir d'eau de mer vieillie au lieu de l'eau distillée et repiquées trois fois avant d'effectuer les tests biochimiques.

Brown (1981) a étalé une partie de ses échantillons sur des géloses d'eau de mer contenant 0,1% de trypticase, 0,1% d'extrait de levure et 1,0% d'agar dilués dans un volume constitué de 80% d'eau de mer vieillie et filtrée et 20% d'eau distillée. La partie restante des échantillons a été gardée durant la nuit dans des tubes vissés et ensuite étalée sur des géloses d'eau de mer. Toutes les géloses furent incubées pendant deux semaines à 26°C. Par la suite, des tubes de bouillons d'eau de mer furent inoculés avec les colonies sélectionnées, incubés durant la nuit à 26°C et étalés sur des géloses pour vérification de la pureté.

Jeanthon et *al.* (1988) ont étudié la composition de la flore de l'eau de mer, qui peut être comparable à celle des mollusques étant donné que ceux-ci se nourrissent par filtration. Ils ont d'abord dilué leurs échantillons d'eau de mer dans de l'eau de mer stérile pour ensuite les étaler sur milieu gélosé 2216E (Marine agar) incubé durant six jours à 18°C et gélose Thiosulfate-Citrate-Bile-Sels-Sucrose (TCBS), connu aussi sous l'appellation de *Vibrio* Selective Agar, durant sept jours à 18°C.

Dans le manuel «*Methods for the microbiological examination of fish and shellfish*», Sakata (1989) y décrit sa technique d'échantillonnage des bactéries marines à partir des poissons, mais qui peut tout autant s'appliquer aux mollusques. En bref, la surface du corps, les branchies et les nageoires sont échantillonnées directement à l'aide d'un coton-tige, d'un manche de Koch ou d'une spatule, ou par excision avec scalpel ou

ciseaux. Avant que le tractus alimentaire ne soit enlevé, la surface du corps est essuyée avec un coton-tige stérile ou trempé dans une solution alcoolisée. Finalement, l'abdomen (ou coquille) est ouvert par dissection aseptique pour prélever le tractus alimentaire et son contenu est par la suite homogénéisé. Des séries de dilution sont étalées sur pétri (Marine agar, SWA ou Simidu's Medium B) et incubées à 20-25°C durant 3-10 jours. De plus, Sakata cite certains milieux sélectifs pour l'isolement des *Vibrio* spp. tel que TCBS, BTB-teepol et *Vibrio* agar. Pour l'isolement de bactéries anaérobies de source marine, les milieux sang EG et les agars PY-G et MAGPC additionnés de 1,5% NaCl (p/v) sont recommandés.

Ringø et Strøm (1994) ont disséqué les spécimens, ouvert les organes pour les rincer trois fois avec de la saline 0,9% pour enlever les bactéries non adhérentes aux parois avant l'homogénéisation dans des sacs stériles. Ensuite, ils ont dilué les homogénats avec la saline 0,9% stérile et des volumes de 0,1 mL de dilutions appropriées ont été étalés sur des pétris de TSAg (TSA 40g/L et glucose 5 g/L) et incubés à 12°C jusqu'à quatre semaines. Après énumération, les colonies sélectionnées ont été repiquées sur TSAg et après confirmation de la pureté, les bactéries ont ensuite été cultivées dans le milieu TSBg (TSB 40g/L et glucose 5g/L).

Dans leur expérience avec les mollusques, Hariharan et al. (1995) ont, premièrement, récupéré leurs spécimens en brossant d'abord les coquilles sous l'eau du robinet et ensuite dans l'eau stérile. Les manteaux et les glandes digestives ont été collectés de façon aseptique, rincés avec de l'eau stérile, dilués 1 : 1 (p/v) avec de la saline (0,85% NaCl) et mélangés séparément dans un Stomacher durant 2 minutes. Pour la culture des bactéries aérobies, les suspensions tissulaires ont été étalées sur gélose sang, gélose sang + 2% NaCl, TSA, TSA + 2% NaCl, MacConkey agar et TCBS agar et incubés à 20 et 37°C. Pour les bactéries anaérobies, les spécimens ont été étalés sur gélose sang pré-réduite et gélose sang + 2% NaCl et incubés dans une chambre ou jarres anaérobies à 20 et 37°C.

Liltved et al. (1995) ont récupéré les bactéries à partir de saumons de l'Atlantique infectés et mis dans un milieu Hitra Broth pour *Vibrio salmonicida* et bouillon nutritif (NB) pour les autres bactéries. Pour le dénombrement des bactéries viables, *V. salmonicida* a été étalé sur gélose sang additionnée de 1,5% NaCl et incubée

à 15°C jusqu'à cinq jours. Pour le dénombrement des autres bactéries, le milieu Heat Infusion Agar additionné de 1,5% NaCl a été utilisé et incubé à 20°C jusqu'à cinq jours.

Dumontet et *al.* (2000) ont d'abord inoculé 90 mL d'eau peptonée + 1% NaCl (p/v) ajustée à pH 8,6 avec environ 10 g de sédiment et incubé le tout durant 24h à 37°C. Par la suite, les cultures ont été striées sur Glutamate Starch Phenol Red (GSP) agar et TCBS agar et incubées pour un autre 24h à 37°C.

Dans son expérience, Torkildsen et *al.* (2000) ont préalablement lavé les spécimens trois fois dans 2,5% d'eau de mer stérile pour poursuivre avec l'homogénéisation dans 10 mL 2,5% d'eau de mer stérile. Finalement, des séries de dilution à base de 2,5% d'eau de mer stérile ont été étalées sur gélose Marine Agar 2216, TCBS et TSA et incubées durant trois jours à 18°C.

Otta et *al.* (2001) ont étalé en duplicata des séries de dilutions d'échantillons d'eau sur TSA additionnée de 1% NaCl et incubée à 29°C durant 24h pour le dénombrement total.

Pour la détection des *Vibrionaceae*, Croci et *al.* (2001) ont d'abord brossé et lavé les spécimens dans de l'eau contenant 5% de Cl₂ actif et rincé avec de l'eau distillée stérile. Ensuite, les corps et eau de l'intervalle ont été retirés de façon aseptique, collectés dans un gobelet stérile avec un volume égal de saline 3% stérile, homogénéisés à l'aide d'un Sterilmixer à 11 000 révolutions / minute durant 20 sec. et dilués dans les diluants utilisés précédemment. Des dilutions d'homogénats (0,1mL) ont ensuite été striés sur gélose TCBS contenant 3% NaCl pour la culture des bactéries.

Waechter et *al.* (2002) ont obtenu les souches bactériennes à partir de broyats de chair des spécimens dilués dans de l'eau de mer stérile et étalés sur deux types de milieux : milieux Zobell, qui permet d'isoler la flore hétérotrophe totale, et le milieu TCBS, sélectif pour la flore *Vibrionaceae*.

Whitman (2004) dans son livre intitulé «*Finfish and Shellfish Bacteriology Manual : techniques and procedures*» y décrit la dissection du pétoncle. En résumé, le muscle adducteur doit être coupé en prenant soin de ne pas toucher aux autres organes. Pour ce qui est de la récupération des bactéries, elle suggère deux techniques selon que le but est de récupérer les bactéries d'organes individuels ou de l'ensemble des organes (broyat). Pour les organes individuels, une portion de l'organe est coupée et servira à

ensemencer un Pétri d'un milieu de culture approprié qui sera incubé à la température ambiante. Pour ce qui est de récupérer les bactéries à partir de l'ensemble des organes, tous les tissus mous sont retirés et placés dans un sac de plastique stérile comprenant 90 mL de saline 0,85%. On homogénéise le tout, on retire un inoculum à l'aide d'un écouvillon stérile et un Pétri d'un milieu de culture approprié est ensemencé et incubé à la température ambiante.

Selon Buller (2004), pour les spécimens d'eau douce, les milieux gélose sang (BA) et MacConkey Agar (MAC) sont à utiliser. Le milieu Tryptone Soya Agar (TSA) pourrait aussi être utilisé et l'addition de sang dans ce milieu pourrait améliorer l'isolement de certains organismes. Pour les spécimens marins, des milieux contenant des ions sodium sont prescrits tels BA et MAC. Le milieu Marine Salt Agar (MSA-B), qui est préparé à partir de TSA avec 5% de sang de cheval et 2% NaCl, ainsi que le milieu Marine 2216, basé sur la formule originale de Zobell (1941), sont des milieux appropriés pour la croissance des bactéries provenant d'organismes marins. Pour ce qui est de l'incubation, pour la majorité des spécimens la température optimale se situe entre 20-25°C et la durée est de 2-5 jours. Pour ce qui est des organismes vivants en eaux froides, elle est de 15-22°C pour une période de 3-5 jours et pour les spécimens des eaux tropicales, la température optimale est de 25°C et la durée est aussi de 2-5 jours.

Évaluation des milieux pour la croissance anaérobie

Hanson et Martin (1976) ont évalué différents milieux pour la culture de bactéries anaérobies soient : AnO₂BA (brain heart infusion broth, 2,5% agar et 5% sang de mouton enrichi de 0,5 µg/mL de vitamine K, 5 µg/mL d'hémine, 0,5% extrait de levure et 0,3 mg/mL chlorhydrate de cystéine), CMBA (commercial blood agar plate) trypticase soy avec 6% de sang de mouton et 1,5% agar, TSA avec 5% sang de mouton et 1,5% agar, et BHI avec 5% sang de mouton et 1,5% agar. Ils ont conclu qu'il était mieux d'utiliser un milieu frais d'AnO₂BA enrichi suivi de BHI et TSA que le milieu commercial et ce même après 12 jours de fabrication. De plus, il est préférable de conserver les géloses à 4°C qu'à température pièce dans une jarre anaérobie.

Murray (1978) a aussi comparé différents milieux pour la croissance des bactéries anaérobies. Le milieu gélosé de sang qu'il a utilisé de façon routinière tout au long de l'expérience était le TSA enrichi de 5% sang de mouton défibriné, d'hémine (0,5 µg/mL), de vitamine K₁ (0,5 µg/mL), de chlorure de cystéine (0,5 µg/mL), et de chlorure de palladium (0,33 mg/mL). Les milieux comparés étaient : brain heart infusion agar (BHIA), Brucella agar (BA), Columbia agar (CA), Schaedler agar (SA), et TSA. Tous les milieux étaient enrichis de 5% sang de mouton, hémine (0,5 µg/mL) et vitamine K₁ (0,5 µg/mL). Les conclusions de l'étude furent que l'utilisation d'agents réducteurs dans les milieux est inefficace pour améliorer la croissance de plusieurs isolats et même qu'ils pouvaient dans certains cas être inhibiteurs. De plus, si le type de milieu est bien choisi, la supplémentation et la réduction semblent inutiles et indésirables.

Mangels et Douglas (1989) ont comparé quatre milieux commerciaux de Brucella agar de composition identique utilisés pour la croissance des bactéries aérobies (brucella agar base, 5% sang de mouton défibriné, hémine et vitamine K) mais de compagnies différentes soient : Anaerobe Systems, BBL, Remel and Scott Laboratories. Anaerobe Systems prépare ses milieux de façon anaérobie et les emballe dans du papier d'aluminium tandis que BBL et Remel and Scott Laboratories les préparent et emballent leur milieu de façon aérobie dans des emballages de cellophane. Ils en ont conclu que la manière de préparation et d'emballage d'Anaerobe Systems permettait une récupération plus efficace des anaérobies que la préparation et emballage de façon aérobie puisque les milieux sont exposés de façon moins prolongée à l'oxygène et que l'emballage d'aluminium réduisait la détérioration des milieux.

Pour ce qui est de la croissance des bactéries marines en anaérobies, le milieu gélosé Marine Agar 2216 a été utilisé de façon efficace à plusieurs reprises (Tanaka, 2003;

Tests bactériologiques pour l'identification de la microflore

Pour l'identification au genre des bâtonnets à Gram négatif mobiles et non-mobiles, Oliver (1982) a utilisé le schéma inclus en **annexe 1 et 2**.

Pour l'identification rapide au genre des *Vibrionaceae*, Colwell (1984) a utilisé le schéma inclus en **annexe 3**.

Dans son expérience, l'équipe de Jeanthon (1988) a utilisé, pour l'identification de ses souches, le système API 20B qui procure 22 tests biochimiques. De plus, les souches ont été étudiées au niveau de leurs morphologie, mobilité, coloration de Gram, présence d'endospores et du métabolisme du glucose.

Pour l'identification rapide au genre des bactéries aquatiques à Gram négatif, Sakata (1989) a utilisé le schéma inclus en **annexe 4**.

En se basant sur quelques revues de littérature et études taxonomiques, Alsina et Blanch (1994) ont permis d'établir quels étaient les tests biochimiques les plus discriminants et faciles à utiliser pour l'identification des *Vibrio* environnementaux. Ceux-ci sont : arginine dihydrolase (ADH) (Moeller), lysine décarboxylase (LDC) (Moeller), ornithine décarboxylase (ODC) (Moeller), tolérance à 0, 6, 8 et 10% de NaCl, croissance à 4, 20, 30, 35 et 40°C, hydrolyse de l'esculine, amygdaline, citrate, gélatinase, indole, luminescence, nitrate, ONPG, oxydase, «swarming», uréase, Voges-Proskauer, décomposition de la xanthine, α -cétoglutarate, D-glucosamine, D-glucose, L-arabinose, lactose, mélobiose, production d'acide à partir de l'arabinose, de l'arbutine, de l'inositol, du mannitol, de la salicine, du sorbitol et du sucrose, résistance à l'ampicilline 10 μ g et à l'agent vibriostatique O/129 10 μ g et 150 μ g. De plus, ils établirent une clef d'identification se basant sur les résultats des tests ADH, LDC et ODC (**annexe 5 - 9**). Il est important de souligner que si des ensembles de tests tels que les systèmes API sont utilisés, ces derniers nécessitent un inoculum très concentré pour donner des résultats clairs aux tests de citrate et certaines acidifications des sucres. Selon Alsina et Blanch (1994), il serait souhaitable d'incuber les échantillons à 20-21°C et d'effectuer deux lectures des résultats à 24 et 48 heures avec les réactifs pour éviter les cas de faux-négatifs. De plus, l'utilisation d'un milieu d'inoculum de concentration de 2% de sels marins, pour remplacer la saline 0,85% recommandée par le manufacturier, permet d'obtenir de meilleurs résultats avec le système API® (MacDonell, 1982).

Dans leur expérience, Hariharan et *al.* (1995) ont d'abord divisé les isolats aérobies selon leur résultat à la coloration de Gram. Par la suite, pour identifier les différentes bactéries à Gram négatif à l'espèce, ils ont utilisé différents tests qui sont : oxydase, sensibilité à l'agent vibriostatique O/129, croissance sur TCBS, fermentation du glucose, du lactose, de la salicine, de l'inositol, du mannitol, du maltose, de l'arabinose, du sucrose et du tréhalose, réduction du nitrate, utilisation du citrate, uréase, production d'indole, catalase et réaction sur Triple Sugar Iron (TSI). Pour la classification des *Vibrio*, les tests de tolérance au sel et de production d'ADH, d'ODC et de LDC furent aussi utilisés.

Dumontet et *al.* (2000) ont d'abord identifié à l'espèce leurs inconnus qui formaient des colonies jaunes entourées d'une zone jaune sur milieu Glutamate Starch Phenol Red (GSP) et des colonies jaunes ou bleues sur TCBS. Ils ont conservé les souches qui s'avèrent être des *Vibrio* et *Aeromonas* suite aux tests de Gram (bâtonnet, négatif), de mobilité (positif), d'oxydase (positif) et confirmé par le système API 20E en utilisant une solution stérile de saline physiologique comme milieu d'inoculation. Les souches classées comme *Aeromonas* ont été identifiées de façon supplémentaire par les tests d'hydrolyse de l'esculine, de fermentation de la salicine, de production de gaz à partir du glucose et de résistance à l'agent vibriostatique O129 (10 et 150 µg).

Dans l'identification de leurs isolats, Torkildsen (2000) a utilisé les tests de coloration de Gram, de résistance au disque O/129 150 µg et ceux inclus dans l'ensemble API 20E, modifié par l'incorporation de NaCl, soit : β -galactosidase, arginine dihydrolase (ADH), ornithine décarboxylase (ODC), lysine décarboxylase (LDC), citrate de Simmons, production de H₂S, uréase (Ferguson), tryptophane déaminase, indole, acétoïne, protéolyse de la gélatine, glucose (oxydation et fermentation), acidification du mannitol, de l'inositol, du sorbitol, du rhamnose, du saccharose, du mélibiose, de l'amygdaline et L(+)-arabinose, oxydase, production de nitrites, production d'azote, catalase et production de gaz à partir du glucose. De plus, certaines souches ont été testées pour la tolérance à différentes concentrations de sels et la présence de flagelle.

Croci (2001) a utilisé les tests d'oxydation et fermentation du glucose, d'utilisation du citrate, de production d'indole, de réduction du nitrate et l'API 20NE

avec 3% de NaCl ajouté pour identifier les souches vertes et jaunes isolées préalablement sur milieu TCBS.

Otta *et al.* (2001) ont utilisé les schémas d'identification de Bain et Shewan (1968), de LeChevalier *et al.* (1980) (**annexe 10-11**) et les tableaux de Farmer III et Hickman-Brenner (1992) pour identifier les bactéries des genre *Vibrio* et *Photobacterium*.

Dans sa caractérisation de bactéries pathogènes de naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas*, l'équipe de Waechter *et al.* (2002) a utilisé les 35 tests suivants pour l'identification à l'espèce des souches recueillies : coloration de Gram, mobilité, présence de flagelle, luminescence, oxydase, gélatinase, uréase, MEVAG, V.F., citrate de Simmons, Kligler-Hajna, acidification de l'arabinose, du mannitol et du saccharose, ADH, LDC, ODC, indole, Voges-Proskauer, nitrate, ONPG, croissances à 0, 6, 8 et 10% NaCl, croissance à 4, 20, 35 et 40°C, croissance α -cétoglutarate, D-glucosamine et L-arabinose. De plus, les milieux et réactifs, à l'exception de ceux testant la tolérance à la salinité, ont été supplémentés avec 2% de NaCl ou d'eau de mer artificielle pour l'étude des souches dites marines.

Autres outils de diagnostic

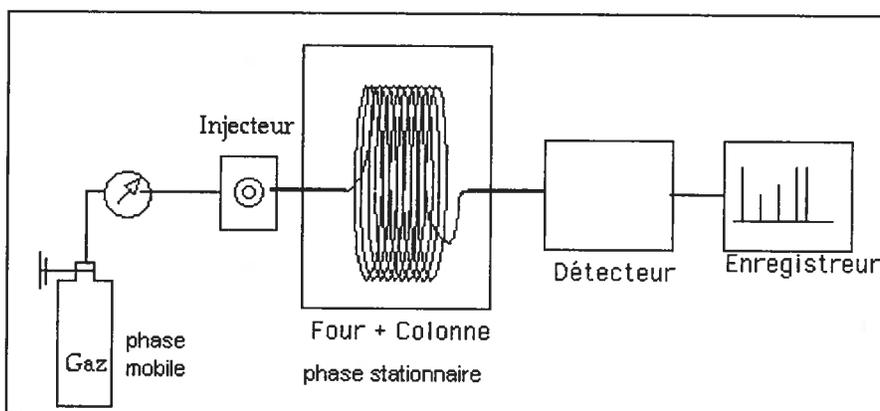
Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse consiste en un fractionnement d'un échantillon vaporisé basé sur la séparation entre une phase mobile gazeuse et une phase stationnaire retenue dans une colonne. Deux types existent, soit une chromatographie gaz-solide, où la phase fixe est un solide, soit une chromatographie gaz-liquide, où la phase stationnaire est un liquide non-volatile soutenu sur une matrice solide inerte (CiSMeF, 2005).

L'analyse des composants se fait par référence aux caractéristiques d'un échantillon connu et en utilisant un gaz comme porteur. L'échantillon à analyser est transporté par un gaz inerte (phase mobile) à travers une colonne contenant un matériau adsorbant revêtu d'un liquide non volatil ou d'un solide (phase stationnaire). Les

molécules de l'échantillon sont poussées par la phase mobile, mais présentent aussi une affinité plus ou moins grande avec la phase stationnaire ; cette affinité provoque une séparation des différentes molécules du gaz. La détection des composants sortant les uns à la suite des autres se fait par un détecteur non spécifique (catharomètre, détecteur à ionisation de flamme ou photomètre de flamme), ou encore un détecteur spécifique (détecteur thermoionique, par capture d'électrons ou spectromètre de masse). Une courbe est enregistrée pour laquelle les pics sont corrélés avec les pics d'une courbe enregistrée pour un mélange-test connu (Office québécois de la langue française, 1990; Lafont, R, 2005).

Figure 1. Différentes parties de la chromatographie en phase gazeuse



(Lafont, R. 2005)

Caractéristiques intéressantes de la chromatographie en phase gazeuse :

- permet une grande adaptabilité par un grand choix de phases stationnaires, de températures et de débit de phase mobile (azote, argon, hélium, hydrogène)
- permet l'emploi de méthodes physiques de détection très sensibles (de l'ordre du picogramme)
- offre des possibilités d'automatisation assurant l'analyse d'un grand nombre d'échantillons (Lafont, R. 2005)

Depuis plus de 40 ans, la chromatographie en phase gazeuse est utilisée pour la détection et l'identification de souches bactériennes et la caractérisation de leurs

métabolites (Henis, 1966; Mitruka et Alexander, 1968; Lavermicocca, 2000). Celles-ci se basent sur la présence et la composition de la cellule ou des métabolites produites par la ou les souche(s) à analyser. Elle permet aussi de diagnostiquer certaines maladies rapidement telles que les infections à bactéries anaérobies à partir du pus (Gorbach, 1976) ou encore l'halitose (Oho, 2001) et les infections à *Neisseria meningitidis* (Wood, 2006) par l'analyse des composés volatils retrouvés dans l'haleine.

Approche génétique

Alsina et Blanch (1994) ont proposé un ensemble de clés pour l'identification biochimique des espèces environnementales du genre *Vibrio*. Cependant, les auteurs ont remarqué d'importantes divergences dans les résultats de certains tests sur les mêmes espèces ce qui entraîneraient une augmentation des difficultés de diagnostic régulier pour les laboratoires. La diversité d'habitats, tant au niveau de l'hôte qu'au niveau environnemental, causerait une diversité phénotypique résultant d'une adaptation par flexibilité physiologique. Ceci pourrait aussi résulter en une biodiversité dans les génotypes. Ainsi, il est très difficile d'établir un protocole de diagnostic basé seulement sur les tests biochimiques qui permettrait avec certitude d'identifier les inconnus. Une approche moléculaire serait donc plus appropriée. Cette dernière inclut le typage de l'ADN tel que ceux ciblant le génome complet (AFLP, RAPD, Rep-PCR, PFGE), un groupe de gènes (ribotypage de l'opéron de l'ARNr (rrn)), des gènes individuels (amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) de l'ADNr 16S, *gyrB*, *rpoD*) et les espaceurs (spacers) des régions intergènes 16S-23S (Paillard, 2004). Plusieurs études utilisent l'approche génétique dans leurs analyses. Huys et *al.* (1996) ont utilisé l'empreinte génétique AFLP (AFLP fingerprinting) qui se base sur la comparaison de régions très variables de l'ADN pour distinguer les espèces d'*Aeromonas*. L'équipe de Kita-Tsukamoto (1993) a utilisé le séquençage ARNr 16S pour déterminer les relations phylogénétiques entre les bactéries marines. Yáñez (2003) a comparé les séquences du gène *gyrB*, qui encode pour la sous-unité B de l'ADN gyrase, pour faire la phylogénie des espèces connues du genre *Aeromonas* et il a remarqué qu'en plus d'être en accordance avec les résultats des séquençages d'ARNr 16S, l'utilisation du gène *gyrB* permettait une plus grande distinction entre les espèces.

Microflore des mollusques

Puisque le pétoncle géant est un animal qui se nourrit par filtration de l'eau, sa flore peut être constituée autant de bactéries provenant de l'eau de mer, des sédiments et du continent que de bactéries qui habitent vraiment le système digestif du mollusque.

Sakata (1989) dans son texte sur la microflore des animaux sains souligne que plusieurs mollusques se nourrissant par filtration et vivants sur les fonds marins ont plus de chance d'être contaminés par des bactéries qui proviendraient du continent, par les eaux usées et les activités économiques par exemple, et qui s'accumuleraient dans les sédiments. De plus, il a été rapporté que la composition générale de la microflore normale du tractus digestif des mollusques marins contenait *Vibrio* et *Pseudomonas* comme genres dominants. Finalement, il a été découvert que les taxons dominants des huîtres cultivées dans des régions polluées étaient *Lactobacillus* spp. et *Aeromonas hydrophila*, tandis que *Vibrio* et *Pseudomonas* étaient les genres dominants dans les régions peu ou non polluées.

Hariharan et al. (1995) rapporte que 76% des bactéries récupérées des huîtres et moules étaient aérobies et 24% anaérobies. De plus, 68% des bactéries aérobies étaient à Gram négatif et étaient, par ordre de fréquence, des *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* / *Shewanella*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp. et *Streptococcus* spp. Pour ce qui est des bactéries anaérobies, 72% étaient à Gram positif et comprenaient, par ordre d'importance, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium sporogenes*, *Bacteroides buccae*, *Fusobacterium mortiferum* et *Clostridium bifermentans*.

Dumontet et al. (2000) ont analysé les sédiments et les eaux des côtes de l'Italie du Sud et ont découvert que les genres *Aeromonas* et *Vibrio* étaient majoritaires autant dans les zones lourdement contaminées par les coliformes fécaux que celles qui l'étaient peu ou pas. De plus, *Aeromonas hydrophila* et *Aeromonas caviae* ont été les espèces les plus isolées durant l'étude.

Otta et al. (2001) ont déterminé la flore de l'eau de mer non traitée et conclurent que *Vibrio* était le genre principal suivi de *Pseudomonas* et *Bacillus*. Pour le reste de la flore, elle était composée de *Moraxella*, *Acinetobacter* et *Aeromonas*. Ils ont aussi

déterminé la flore des aquariums où sont cultivées les larves de crevette *Penaeus monodon* Fabricius et la flore de ces dernières. Leurs compositions étaient aussi majoritairement faites de *Vibrio* mais en plus grande proportion et les espèces principales étaient *Vibrio alginolyticus* suivi de *Vibrio harveyi*.

Dans son étude sur la détection des *Vibrionaceae* dans les moules, l'équipe de Croci (2001) a isolé, par ordre d'importance, les genres *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Pasteurella / Ochrobactrum* et *Agrobacterium*. De plus, *Vibrio alginolyticus* suivi d'*Aeromonas salmonicida* et d'*Aeromonas hydrophila / caviae* sont les espèces les plus fréquemment retrouvées dans cette expérience.

Waechter et al. (2002) ont isolé trois genres principaux à partir d'un naissain moribond d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* : (1) souches apparentées au groupe *Cytophaga / Flavobacterium*, (2) souches apparentées au groupe *Agrobacterium* et (3) souches appartenant aux *Vibrio*.

Description des genres susceptibles d'être rencontrés chez les mollusques et les tests permettant leur distinction

Les genres

Le genre Acinetobacter

Les espèces du genre *Acinetobacter* sont constituées de bactéries à Gram négatif (pouvant cependant résister à la décoloration), non sporulées, plusieurs possèdent une capsule, immobiles (mais pouvant présenter une mobilité par saccade résultant de la présence de fimbriae polaires), aérobies strictes, à métabolisme respiratoire strict, catalase positive et oxydase négative. En phase exponentielle de croissance, les *Acinetobacter* sp. se présentent sous la forme de courts bâtonnets souvent en paires ou parfois en chaînes de longueur variable. En phase stationnaire, les bactéries peuvent prendre une forme plus sphérique ou filamenteuse. Les *Acinetobacter* sont négatifs pour les tests de réduction des nitrates sur milieu complexe, LDC, ODC, ADH, production de H₂S, indole, bêta-galactosidase et DNase. La majorité des espèces pousseront à 33°C, mais les isolats environnementaux préféreront une température se situant entre 20 et

30°C. Sur une gélose trypticase soja incubée à 30°C, les colonies sont convexes, circulaires, lisses, translucides ou légèrement opaques, muqueuses pour les souches capsulées et non pigmentées. Quelques souches de *Acinetobacter* espèce génomique 3 ont une odeur fruitée. Les *Acinetobacter* sont considérés comme des bactéries ubiquistes ayant pour principal habitat le sol, les eaux, les végétaux, la peau saine de l'homme et des animaux (Towner, 2001; Euzéby, 2003; Juni, 1984).

Le genre *Aeromonas*

Ce genre fait partie de la famille *Aeromonadaceae*. Le genre se divise en deux groupes, basés sur la température optimale de croissance et la mobilité, soient : 1) les espèces psychrophiles et immobiles causant des maladies chez les poissons et connues sous le terme des *Aeromonas salmonicida* (éventuellement avec ses 5 sous-espèces : *salmonicida*, *achromogenes*, *masoucida*, *pectinolytica* et *smithia*) et 2) les espèces mésophiles et mobiles causant des infections chez l'humain et contenant, anciennement, trois espèces : *A. hydrophila*, *A. caviae* et *A. sobria* (Popoff, 1984; Austin et al., 1989; Krocavek, 1996), mais maintenant ce nombre a de beaucoup augmenté et serait de 26 espèces et sous-espèces (Euzéby, 2003; Janda et Abbott, 1998). Plus récemment, l'utilisation des techniques de réassociation ADN-ADN permet d'établir 14 groupes d'hybridation dont HG1 et HG3 qui contiennent les souches types d'*A. hydrophila* et *A. salmonicida* entre autres (Huys et al., 1996). Les *Aeromonas* sont des bâtonnets non-sporulants, à Gram négatif, droits à extrémités rondes jusqu'à coccoïdes et se présentant seul, en paire ou en courte chaîne. Mobiles en milieu liquide grâce à un flagelle polaire non engainé (excepté *A. salmonicida* qui est non-mobile), ils peuvent former des flagelles péritriches plus courts lors de la croissance sur milieu solide chez les jeunes cultures. Ce sont des anaérobies facultatifs capables de métabolisme fermentaire et respiratoire sur D-glucose. Ils produisent des acides et du gaz lorsqu'ils métabolisent les hydrates de carbone et réduisent le nitrate au nitrite. Oxydase et catalase positives, la température optimale de croissance se situe entre 22-28°C. Ils sont chimio-organotrophes et résistent à l'agent vibriostatique O/129 et à la novobiocine. Lorsque cultivé sur milieu Nutrient Agar durant 48 heures à 22°C, les colonies d'*A. salmonicida* sont rondes, surélevées, entières, translucides, friables et la majorité produisent un

pigment brun soluble dans l'eau. Sur Nutrient Agar, les colonies d'*Aeromonas* mobiles sont rondes, surélevées, entières, lisses, translucides et de couleur blanc à chamois. L'odeur qu'elles dégagent varie d'extrêmement forte à absente. Tous les *Aeromonas* produisent des acides à partir du glucose et du maltose mais pas à partir du xylose, du dulcitol, d'inositol, d'adonitol, du malonate et du mucate. Tous possèdent une gélatinase, déoxyribonucléase, ribonucléase et une estérase Tween 80. Finalement, aucun *Aeromonas* ne produit de H₂S. Les tests positifs pour *A. salmonicida* sont : la fermentation de l'arabinose, le tréhalose, le galactose, le mannose et la dextrine; de l'arginine dihydrolase, arginine déaminase, ornithine transcarbamylase, carbamyl phosphokinase, carbamyl phosphatase et adénosine tri-, di- et monophosphatases. Les tests négatifs pour *A. salmonicida* sont : tests de croissance dans le milieu KCN, dans le milieu Nutrient broth avec 7,5% NaCl, uréase, ornithine décarboxylase, tétrathionate réductase, acidification du rhamnose, sorbose, sorbitol, lactose, raffinose et cellobiose. Les *Aeromonas* mobiles sont positifs pour les tests de : catalase, hydrolyse de l'amidon, lécithinase, phosphatase, arginine dihydrolase, hydrolyse de l'ONPG, croissance sans NaCl et la fermentation du mannitol, tréhalose, fructose, galactose et dextrine; et sont négatifs pour les tests de : pectinase, ornithine décarboxylase, tryptophane et phénylalanine déaminase, croissance sur agar cétrimide, croissance dans milieu Nutrient broth avec 5% NaCl, acidification du sorbose, érythritol et raffinose. Présents dans l'eau douce et polluée et dans les aliments (principalement les fruits de mer), certains *Aeromonas* sont pathogènes pour les poissons, les amphibiens et l'humain (Popoff, 1984; Gibson, 1977; Skerman, 1976; Farmer III, 1992; Krovacek, 1996).

Le genre *Agrobacterium*

Le genre *Agrobacterium* fait parti des *Rhizobiaceae* tout comme les genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Phyllobacterium*. Il est constitué de bactéries en forme de bâtonnets seuls, Gram négatif qui peuvent former des agrégats en forme d'étoile ou de rosette, non sporulant et possédant quelques flagelles péritriches. Aérobie, toutes les souches catabolisent le glucose de manière oxydative, mais certaines sont capables de respiration anaérobie en présence de nitrate. Toutes les souches sont oxydase, catalase et uréase positives et produisent de l'acide à partir d'une large variété d'hydrates de

carbone et sucre-alcools incluant D-glucose, L-arabinose, D-xylose, D-fructose, L-rhamnose, lactose, maltose, cellobiose, tréhalose, salicine, adonitol et D-mannitol. Toutes les agrobactéries sont négatives pour la production d'indole et l'hydrolyse de l'amidon, la chitine, le tween 80 et la gélatine. Leur température optimale de croissance se situe entre 25-28°C et les colonies sont habituellement convexes, circulaires, lisses, non-pigmentées à beige clair. La majorité des souches d'*Agrobacterium* sont des phytopathogènes et leurs habitats naturels sont sur et autour des racines et pédoncules de plantes susceptibles. Finalement, toutes les espèces du genre *Agrobacterium* ont été reclassées dans les genres *Stappia*, *Ruegeria*, *Pseudorhodobacter* et la majorité comme *Rhizobium* (Kerr, 1992; Kersters et De Ley, 1984; Euzéby, 2003; Young, 2001).

Le genre *Bacillus*

Ce sont des bâtonnets à Gram positif pléomorphes qui produisent des endospores et dont la majorité sont mobiles grâce à leurs flagelles péritriches. Ils sont soit aérobies ou anaérobies facultatifs, catalase positif pour la majorité des espèces, généralement négatifs pour les tests de Voges-Proskauer, de citrate, d'indole, de propionate, de production de gaz à partir du D-glucose, ne nécessitent pas de NaCl (excepté *B. megaterium*) et sont oxydase positive ou négative. La morphologie des colonies est très variable car elle dépend des conditions de culture. De plus, certaines espèces peuvent produire des pigments noir, jaune, orange/brun ou rouge sous certaines conditions. Finalement, la plupart des espèces sont largement distribuées dans la nature dû à leur capacité à sporuler, mais le sol est considéré comme l'habitat primaire de la majorité des espèces. (Claus et Berkeley, 1984)

Le genre *Clostridium*

Bâtonnets à Gram positif formant des endospores ovales ou sphériques qui déforment habituellement la cellule. La plupart des espèces est catalase négative et anaérobie obligatoire, mais la tolérance à l'oxygène varie grandement; certaines espèces vont croître, mais ne sporuleront pas en présence d'air et à pression atmosphérique. Pour la majorité des espèces, les conditions optimales de pH et température se situent proche de la neutralité et entre 30-37°C. Les *Clostridium* sont ubiquistes, ils sont

fréquemment retrouvés dans le sol, les eaux usées, les sédiments marins, la végétation en décomposition, les produits des animaux et des plantes, dans le tractus intestinal de l'homme, d'autres vertébrés et insectes, et dans les blessures ou les infections des tissus mous chez l'humain et les animaux (Cato, 1984).

La famille *Enterobacteriaceae*

Cette famille est caractérisée par des bactéries en forme de bâtonnet droit à Gram négatif, mobiles via des flagelles péritriches, excepté le genre *Tatumella* qui possède des flagelles polaires, ou non-mobiles. Ils ne forment pas d'endospore ni de microcyste et ne sont pas alcool-acido-résistants. Ils sont anaérobies facultatifs et poussent bien sur le milieu peptoné, sur extrait de viande et habituellement sur milieu MacConkey. Les *Enterobacteriaceae* possèdent un métabolisme respiratoire et fermentaire et sont non halophiles. Des acides et souvent du gaz sont produits lors de la fermentation du D-glucose, d'autres hydrates de carbone et d'alcools polyhydroxyliques. Catalase positive (excepté *Shigella dysenteriae* 0 groupe 1 et *Xenorhabdus nematophilus*), oxydase négative et nitrate positif sauf pour certaines espèces d'*Erwinia* et de *Yersina*. La famille *Enterobacteriaceae* comprend les genres *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Serratia*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Yersina*, *Obesumbacterium*, *Xenorhabdus*, *Kluyvera*, *Rahnella*, *Cedecea* et *Tatumella*. Ils sont distribués mondialement. Ils sont retrouvés dans le sol, l'eau, les fruits et légumes, les graines, les plantes à fleurs et arbres, et chez les animaux jusqu'aux humains en passant par les insectes (Brenner, 1984).

Le genre *Flavobacterium*

Anciennement groupé avec les genres *Chromobacterium*, *Pseudomonas* et *Serratia* dans la famille *Chromobacteraceae* à cause de sa pigmentation jaune, le genre *Flavobacterium* fait maintenant partie de la famille des *Flavobacteriaceae* et inclus l'ancien genre *Cytophaga* qui s'y rapprochait beaucoup. Ce sont des bâtonnets avec des côtés parallèles et des extrémités rondes. Ils ne possèdent pas de granules de poly-β-hydroxybutyrate (PHB) ni ne produisent d'endospore. Bactéries à Gram négatif et non-mobiles, les «*Flavobacterium*» peuvent se déplacer par glissement (en fait, ce sont les

Cytophaga inclus maintenant dans ce genre qui sont capables de déplacement par glissement et «swarming»). Aérobes, ils ne possèdent qu'un métabolisme de type respiratoire. Les isolats environnementaux sont capables de croître à des températures se situant entre 5 et 30°C; la plupart des isolats cliniques ont une croissance aussi à 37°C. La croissance sur milieu solide est typiquement pigmentée (jaune à orange), mais des souches non pigmentées peuvent aussi être isolées. Les colonies sont translucides (parfois opaques), circulaires (diamètre de 1-2 mm), convexes ou peu convexes, lisses, brillantes à bordure entière. Les espèces de ce genre sont catalase, oxydase et phosphatase positives. Ils métabolisent le glucose, le fructose, le glycérol, le maltose et le tréhalose. Les *Flavobacterium* n'acidifient pas l'adonitol, le dulcitol, l'inositol et le sorbitol. La cellulose, l'agar et autres hydrates de carbone à poids moléculaire élevé ne sont pas attaqués. La majorité des souches sont protéolytiques, hydrolysant la caséine et la gélatine. Les *Flavobacterium* sont DNase positive, nitrate négative, majoritairement MacConkey positive, uréase positive, ONPG positive et généralement hydrolyse de l'esculine positive. Les tests suivants sont invariablement négatifs pour ce genre : tolérance au KCN, production de H₂S, oxydation du gluconate, utilisation du malonate, désamination de la phénylalanine, production d'une arginine dihydrolase (ADH) et d'une ornithine et lysine décarboxylase (ODC et LDC). Les souches sont isolées à partir de l'eau douce et marine, du sol et sédiments, de la nourriture, de plante et de matériels cliniques. Finalement, les espèces se divisent en sous-groupes, soient les groupes A à D, selon leurs résultats aux tests de résistance aux antibiotiques, qu'elles possèdent une pigmentation jaune ou non, qu'elles produisent de l'indole, qu'elles oxydent les hydrates de carbone et possèdent une activité protéolytique et finalement, qu'elles survivent de façon intracellulaire ou libre («free-living») (Holmes, 1984; Holmes, 1992; Euzéby, 2003; Gibson, 1977).

Le genre *Fusobacterium*

Ce sont des bâtonnets non-sporulant à Gram négatif, anaérobies stricts, mobiles et non-mobiles, non fermentaires ou faiblement fermentaires. Tous les *Fusobacterium* produisent une glutamate déshydrogénase et possiblement une désoxyribonucléase. La majorité des espèces croît sur milieu contenant des peptones et de l'extrait de levure et la

croissance est habituellement plus rapide à 37°C et à un pH neutre. Finalement, leurs habitats sont les membranes muqueuses des humains et des animaux, particulièrement la cavité orale et le tractus gastro-intestinal (se retrouve donc dans les fèces) (Hofstad, 1999; Moore et *al.*, 1984).

Le genre *Lactobacillus*

Ce sont des bâtonnets à Gram positif non-sporulants, catalase négative lorsqu'ils poussent en absence de sang, habituellement ils ne réduisent pas le nitrate et sont non-mobiles. Ce sont des micro-organismes fermentaires et qui nécessitent des conditions nutritionnelles complexes. Les *Lactobacillus* ne sont pas considérés comme des agents pathogènes mais plutôt comme des opportunistes. La présence des *Lactobacillus* dans le sol et l'eau dépend du contenu des substrats fermentables. Ainsi, ils sont plus fréquents dans les sols où les plantes poussent et ils y constituent une partie de la rhizosphère. De plus, on ne les retrouve pas dans l'eau douce ou de mer mais plutôt dans les eaux usées. Donc, si on retrouve des *Lactobacillus* à l'intérieur des pétoncles cela s'explique par le fait que ces dernières se nourrissent par filtration et que les contaminants terrestres peuvent aussi être absorbés (Hammes et *al.*, 1992; Kandler et Weiss, 1984).

Le genre *Moraxella*

Faisant partie de la famille *Moraxellaceae*, le genre est constitué de deux sous-genres soient *Moraxella* et *Branhamella*. Les deux sous-genres forment des bactéries à Gram négatif, aérobies strictes, non-pigmentées, à oxydase et catalase positives, non fermentaires, non mobiles et incapables de produire des acides à partir des hydrates de carbone. La réduction des nitrates est généralement positive et la température optimale de croissance se situe autour de 33-35°C. La principale caractéristique qui distingue les sous-genres *Moraxella* et *Branhamella* est la morphologie cellulaire. Les espèces du sous-genre *Moraxella* produisent de gros bâtonnets qui sont souvent émoussés et dodus, apparaissant fréquemment sous une forme coccoïde. En contraste, les espèces *Moraxella* (*Branhamella*) forment des petites coques habituellement en paire avec les côtés adjacents plats semblable aux *Neisseria*. Les agents infectieux de ce genre sont : *M. atlantae*, *M. bovis*, *M. canis*, *M. caprae*, *M. equi*, *M. lacunata*, *M. lincolni*, *M.*

nonliquefaciens, *M. osloensis* et *M. phenylpyruvica*. Les *Moraxella* sont des parasites des muqueuses des humains et autres mammifères et peuvent causer des maladies respiratoires, des infections des yeux (4^e cause des infections de la cornée), des otites moyennes, des endophtalmies, des bactériémies, des arthrites septiques, des pneumonies, des péricardites purulentes et des méningites. L'infection peut se transmettre par contact direct ou via des insectes volants. Ainsi, si des espèces du genre *Moraxella* se retrouve dans l'eau et la microflore des pétoncles géants c'est qu'il y eu contamination terrestre (Doern, 1992; Bøvre, 1984; Santé Canada, 2001).

Le genre *Ochrobactrum*

Le genre *Ochrobactrum* est constitué de bacilles à Gram négatif, aux extrémités arrondies, non sporulés, mobiles grâce à une ciliature péritriche (la ciliature peut être dégénérée et réduite à un ou à deux flagelles), strictement aérobies, à métabolisme respiratoire, oxydase et catalase positives, incapable d'hydrolyser le Tween 80, l'esculine, la gélatine, l'ADN, l'amidon ou la caséine, indole négatif, oxydant le glucose et le xylose mais pas le lactose et réduisant le nitrate. La température optimale de croissance est comprise entre 20 et 37 °C et sur gélose nutritive, les colonies sont non pigmentées. Les habitats des *Ochrobactrum* sont principalement le sol et l'eau, mais certaines espèces peuvent être retrouvées en milieu hospitalier (Euzéby, 2003; Swings, 1992).

Le genre *Pasteurella*

Genre type de la famille *Pasteurellaceae*, les *Pasteurella* sont des petits coques ou bâtonnets à Gram négatif, non-mobiles, anaérobie facultatif, à métabolisme fermentaire, catalase et oxydase positives, réduisant les nitrates, fermentant le glucose, mannose, galactose, saccharose et raffinose en produisant des acides mais généralement sans gaz. Les *Pasteurella* sont négatifs pour les tests de ONPG, uréase, ornithine décarboxylase (ODC), lysine décarboxylase (LDC), arginine décarboxylase (ADC), hydrolyse de l'esculine, croissance sur MacConkey (à l'exception de *P. trehalosi* et *P. aerogenes*), fermentation de cellobiose, dulcitol, salicine, méso-inositol, lactose et mélibiose, méthyl-red, Voges-Proskauer et gélatinase. Leur température optimale de

croissance est 37°C. Les *Pasteurella* produisent des colonies rondes et grisâtres sur milieu solide. Puisque *P. multocida* possède une capsule, cela lui donne un aspect mucoïde. Les membres de ce genre sont habituellement retrouvés comme organismes commensals sur les membranes muqueuses du tractus respiratoire supérieur et du tractus digestif des mammifères et oiseaux en santé. Donc, les *Pasteurella* se retrouvent dans la microflore des pétoncles par contamination fécale (Euzéby, 2003; Lo et Shewen, 1992; Carter, 1984).

Le genre *Pseudomonas*

Ce genre fait partie de la famille des *Pseudomonaceae* tout comme les genres *Xanthomonas* (le genre le plus proche phénotypiquement des *Pseudomonas*), *Frateuria* et *Zoogloea*. Il regroupe des bâtonnets droits ou courbés, qui peuvent être dans certains cas très courts ou très longs, à Gram négatif, non-sporulants, mobiles grâce à un ou plusieurs flagelle(s) polaire(s) (excepté *P. mallei*) et certaines espèces peuvent aussi produire des flagelles latéraux plus courts. Ces bactéries sont aérobies strictes avec métabolisme oxydatif seulement. Dans certains cas, c'est le nitrate qui sera l'accepteur final d'électrons alternatifs permettant la croissance anaérobie. Ils sont catalase positive et généralement oxydase positive et plusieurs espèces accumulent du poly-β-hydroxybutyrate (PHB) comme réserve de carbone. Ces organismes ne produisent pas de capsule et la majorité de ces bactéries, sinon toutes, sont incapables de croître en condition acide (pH 4,5). Ils ne fixent pas l'azote et ne produisent pas de H₂S. Ils sont DNase positive, ornithine décarboxylase négative et arginine dihydrolase positive. Ils sont résistants à la pénicilline et ne nécessitent pas de Na⁺ pour croître. Ils sont capables de croître à 4°C et moins et jusqu'à 43°C, et leur température optimale est de 28°C (mésophiles). De plus, les *Pseudomonas* produisent des colonies plates à bordure étendue d'apparence mucoïde dont certaines espèces sont capables de produire des pigments solubles (fluorescent et phénazine) et insolubles (caroténoïdes) mais pas de pigment cellulaire jaune caractéristique aux *Xanthomonas*. Largement distribué dans la nature, plusieurs espèces sont phytopathogènes et certaines sont pathogènes pour les animaux et les humains (Palleroni, 1999; Palleroni, 1992; Palleroni, 1978; Gibson et al., 1977; Larpent; 2000).

L'espèce *Roseobacter gallaeciensis*

Cette espèce est la seule d'intérêt en médecine vétérinaire car elle possède une activité antibactérienne vis-à-vis les *Vibrio* sp. et un effet probiotique sur la croissance des mollusques. Décrite pour la première fois en 1998, cette espèce a été isolée de l'eau de mer des élevages de coquilles St-Jacques et de la surface des collecteurs permettant la fixation des larves. *R. gallaeciensis* produit des bâtonnets ovoïdes à Gram négatif, mobiles grâce à une ciliature polaire, oxydase et catalase positives, sensibles à l'agent vibriostatique O/129 (150 µg), halophiles et à métabolisme oxydatif. Cette espèce assimile entre autres le cellobiose, le D-fructose, le D-galactose, le D-glucose, le glycérol, le maltose, le D-mannitol, le D-mannose, le saccharose, le tréhalose et le D-xylose. Une réponse négative est obtenue pour les tests ADH, LDC, ODC, amylase, nitrate réductase, DNase, bêta-galactosidase, gélatinase, uréase et hydrolyse du Tween 80. Sur le milieu Marine Agar 2216 (Difco), cette espèce croît à des températures d'incubation comprises entre 15 et 37°C (optimum : 23 à 27°C), pour une concentration en NaCl variant de 1,1 à 2 M et pour un pH compris entre 7,0 et 10,0 (optimum : 7,0). Après 72 à 96 heures d'incubation à 23°C, les colonies sont petites (0,5 mm de diamètre), lisses, convexes, à contour régulier et légèrement brunâtres. Après 7 jours d'incubation, les colonies ont un diamètre de 2 mm, elles sont brunes et présentent un contour irrégulier (Euzéby, 2003).

Le genre *Shewanella*

Les espèces du genre *Shewanella* sont constituées de bâtonnets à Gram négatif, droits ou incurvés, non sporulés, mobiles grâce à un flagelle polaire unique non engainé, possédant un métabolisme oxydatif seulement (et production d'H₂S sur milieu TSI pour *Shewanella putrefaciens* seulement), capables de croître en présence de 3% NaCl, oxydase et catalase positives (excepté *Shewanella putrefaciens* qui serait catalase négative), nitrates positifs, indole négative, lysine décarboxylase (LDC), ornithine décarboxylase (ODC) et arginine dihydrolase (ADH) négatives. Les colonies sont généralement circulaires, à contour régulier, convexes, lisses et d'un diamètre de 1 à 4 mm. *Shewanella benthica*, *Shewanella hanedai*, *Shewanella pealeana* et *Shewanella*

woodyi donnent des colonies rosâtres après culture sur le milieu Marine Agar. *Shewanella violacea* produit un pigment violet et *Shewanella waskmanii* un pigment verdâtre ou brunâtre. Finalement, les *Shewanella* sont principalement associés aux milieux aquatiques d'eau douce et d'eau de mer (Euzéby, 2003; Farmer III, 1999).

Le genre *Staphylococcus*

Ce genre fait parti de la famille *Staphylococcaceae*, qui inclut aussi les genres *Gamella*, *Macrococcus* et *Salinicoccus*. Il forme des coques à Gram positif seuls, en paires et grappes (dues à la division cellulaire qui se produit sur deux plans), anaérobies facultatives, à catalase positive, non-mobiles et possédant un métabolisme respiratoire et fermentaire. La majorité des espèces possède une réaction négative au test rapide et modifié d'oxydase, croît en présence de 10% de NaCl et à des températures se situant entre 18-40°C, est sensible à la lysostaphine, furazolidone et nitrofurane, et est résistante à une faible concentration d'érythromycine et de bacitracine. Même si le genre contient 36 espèces et plusieurs sous-espèces, seules les espèces *S. aureus* et *S. epidermidis* (anciennement *albus*) sont d'intérêt médical car *S. aureus* peut provoquer des infections de la peau (ex. : furoncles), des pneumonies, des méningites, des infections du tractus urinaire, des ostéomyélites, des endocardites, des infections nosocomiales, des empoisonnements alimentaires et le syndrome du choc toxique. *S. epidermidis* n'est pas considéré comme une espèce pathogène, elle posséderait même un effet protecteur pour l'hôte en faisant partie de la flore normale de la peau, mais elle peut provoquer des infections nosocomiales. *S. aureus* fait partie de la flore normale de la voie nasale, de la peau et des muqueuses de la peau, tandis que *S. epidermidis* est un habitant normal de la peau. On les distingue par leur pigmentation qui est jaune pour *S. aureus* et blanche pour *S. epidermidis*, le test de coagulase qui est positif pour *S. aureus* et négatif pour *S. epidermidis*, la capacité de *S. aureus* à fermenter le mannitol et le test d'hémolyse sur gélose sang qui est négatif pour *S. epidermidis* et positif pour *S. aureus* qui produit une double hémolyse (ce qui distingue cette espèce de tous les autres *Staphylococcus*) (Kloos et Schleifer, 1984; Götz, 2003; Todar, 2005).

Le genre *Streptococcus*

Ce genre forme des coques à Gram positif se présentant en paire ou en chaîne (due à la division cellulaire qui ne se fait que sur un plan) (surtout en milieu liquide), habituellement non-mobiles et la majorité des espèces sont anaérobies facultatives. Ils possèdent un métabolisme fermentaire, ont une réaction négative au test de catalase, leurs exigences nutritionnelles sont complexes et variées et la température optimale de ce genre se situe habituellement autour de 37°C. Les streptocoques sont d'abord classés selon leur propriété hémolytique, i.e. qu'ils soient capables d'hémolyse bêta, alpha ou gamma. Pour les espèces groupables, celles-ci peuvent aussi être classées en 18 groupes antigéniques (A à H et K à T) dont la plupart sont basés sur les antigènes de paroi (sérotypage de Lancefield). Les espèces non groupables sont principalement celles constituant la flore oro-pharyngée normale ou *Streptococcus viridans* et les pneumocoques (*Streptococcus pneumoniae*). En raison de leur nombre, on distingue les espèces pathogènes des espèces commensales et saprophytes. Les *Streptococcus* pathogènes comprennent : *S. agalactiae* (mammite chez les bovins et infection chez le poissons), *S. gallolyticus* (mammite chez les bovins et septicémies chez certains oiseaux), *S. canis* (infection de la peau, surinfection des plaies, otite externe, pharyngite, infection vaginale, etc. chez le chien et septicémie chez le chaton entre autres), *S. dysgalactiae* sous-espèce *equisimilis* (infection chez le chat, le chien, les cétacés, les équidés, les porcs et les ruminants), *S. equi* sous-espèce *equi* (gourme des équidés), *S. equi* sous-espèce *zooepidemicus* (métrite, avortement, épидидymite, infection ombilicale et pneumonie suite à des infections virales ou stress chez le cheval, cervicite, métrite et mammite chronique chez les bovins, pleurésie fibreuse, pneumonie et péricardite chez l'agneau, mammite chez la chèvre, pneumonie et septicémie chez le phoque, arthrite, avortement et septicémie chez le porc), *S. iniae* (abcès sous-cutanés chez le dauphin d'eau douce et méningite et méningo-encéphalite chez le tilapia et la truite), *S. ovis* (abcès et arthrite en association avec d'autres bactéries chez les ovins), *S. phocae* (surinfections chez les mammifères marins), *S. pneumoniae* (infection respiratoire chez les ruminants et cheval), *S. porcinus* (lymphadénite cerviale et avortement chez le porc, entérite et infertilité chez les bovins et ovins et mammite chez les bovins), *S. suis* (méningite, septicémie, arthrite, encocardite, encéphalite, polysérotite, avortement,

pneumonie et abcès chez le porc, les ruminants et le cheval), et finalement, *S. uberis* et *parauberis* (principale cause de mammites chez les bovins, septicémie chez le veau, porc et vison, encéphalite chez le porc et avortement chez les bovins et équidés)(Wikipédia, 2005; Hardie, 1984; Higgins, 2003).

Le genre *Vibrio*

Fait partie de la famille *Vibrionaceae*. Ce sont des bâtonnets à Gram négatif droits ou courbés capables de fermentation et de respiration. Ils ne produisent pas d'endospore ou de microcyste. Dans un milieu liquide, ils sont mobiles grâce au flagelle polaire encapsulé mono- ou multitrèche. Sur milieu solide, ils peuvent exhiber une flagellation mixte avec des flagelles additionnels péritriches non encapsulés plus courts que le flagelle polaire encapsulé. Il est à noter que les flagelles latéraux sont nécessaires pour le phénomène de «swarming» utilisé dans la caractérisation de plusieurs espèces de *Vibrio*. Anaérobies facultatifs, ils acidifient le D-glucose sans production de gaz. Tous les *Vibrio* utilisent D-glucose, D-fructose, maltose et glycérol. La majorité des souches sont oxydase positive et capable de réduire les nitrates. Tous poussent à 20°C et la majorité sont capables de croître à 30°C. La croissance est stimulée par la présence d'ions Na⁺ et la majorité des espèces ne peut pousser sans cet ion d'où le concept des bactéries marines : bactéries qui nécessitent absolument du sodium pour croître car ce dernier permet de conserver l'intégrité de la paroi cellulaire et est essentiel pour le fonctionnement des systèmes de perméases impliqués dans l'absorption des acides aminés, hydrates de carbone et autres éléments nécessaires à la croissance bactérienne. Ils sont sensibles à l'agent vibriostatique O/129 et à la novobiocine. Ils accumulent le poly-β-hydroxybutyrate (PHB) comme réserve intracellulaire et la majorité sont lipase positive et mannitol positif. Sur milieu solide, les *Vibrio* forment des colonies blanches, convexes, lisses, crémeuses à bordure entière. Certaines variations dans la morphologie peuvent avoir lieu et les colonies apparaissent comme raboteuses et parfois «rugueuses»; ces dernières semblent être attachées fermement au milieu et ne peuvent être émulsionnées. Il est à noter que certains *Vibrio* sont capables de pigmentation : *V. nigripulchritudo* produit un pigment noir-bleu sur milieu minimal, *V. gazogenes* produit un pigment rouge et *V. fischeri* et *V. logei* produisent un pigment jaune-orange associé à

la cellule après une incubation de 3-4 jours sur milieu solide. De plus, certaines souches de *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. splendidus*, *V. fischeri* et *V. logei* sont capables d'émettre une lumière de couleur bleu-vert, phénomène que l'on nomme bioluminescence. Ils sont retrouvés dans les habitats aquatiques avec un large spectre de salinité. Les *Vibrio* sont très communs dans les environnements marins et les estuaires, sur la surface et dans le contenu intestinal des animaux marins. Certaines espèces sont retrouvées dans les habitats d'eau douce et plusieurs sont pathogènes pour l'homme, les vertébrés et invertébrés marins (Baumann et Schubert, 1984; Baumann et *al.*, 1984; Colwell, 1984; Larpent, 2000; Gibson, 1977; Farmer III, 1992; Farmer III et Hickman-Brenner, 1992; Euzéby, 2003).

Tests permettant la distinction des genres

(D'après les informations citées dans la section précédente)

Tout d'abord, les genres peuvent être distingués en deux grands groupes en se basant sur la constitution de leur paroi par leur capacité ou non de retenir le cristal violet lors de la coloration de Gram. Ainsi, les bactéries seront classées dans la catégorie des Gram positif si elles réussissent à retenir le cristal violet et dans la catégorie des Gram négatif si elles ne le peuvent pas. Ceci permet de séparer les genres *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptococcus* et *Staphylococcus* des autres genres mentionnés préalablement. Pour ce qui est des genres bactériens à Gram négatif, l'analyse du métabolisme des sucres par le test en tube «Glucose O/F» (oxydation/fermentation) permet de séparer les genres dits fermentaires des autres dits oxydatifs. Ainsi, les genres *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium* (anaérobe strict), *Moraxella*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas* et *Shewanella* peuvent être sous-classés dans la catégorie des oxydatifs tandis que les genres *Aeromonas*, ceux faisant partie de la famille des *Enterobacteriaceae*, *Pasteurella* et *Vibrio* seront sous-classés dans la catégorie des fermentaires. Les membres de la famille des *Aeromonadaceae* se distinguent de ceux de la famille des *Vibrionaceae* par leur résistance à l'agent vibriostatique O/129, l'absence de flagelle polaire engainé, l'absence d'exigence en Na^+

pour croître, l'incapacité de croître dans l'eau peptonée avec 6% de NaCl et finalement, par son ADN qui possède un contenu supérieur en G+C se situant entre 57-63 au lieu de 38-51 pour les *Vibrionaceae*. Les *Pasteurella* se différencient des *Aeromonas / Vibrio* par sa réaction de fermentation au test de TSI qui consiste plus en un jaunissement qu'une acidification prononcée du milieu et parce qu'ils sont non-mobiles. Les *Pasteurella* se distinguent de l'espèce *Aeromonas salmonicida* par le fait que la majorité des *Pasteurella* est indole positive, qu'ils sont MacConkey négative et non-hémolytiques et ne produisent pas le pigment brun soluble caractéristique des *A. salmonicida*. Les entérobactéries se distinguent de la branche des *Aeromonadaceae*, *Vibrionaceae* et *Pseudomonaceae* par le test d'oxydase qui lui est négatif. De plus, les *Enterobacteriaceae* se distinguent des *Vibrionaceae* et *Aeromonadaceae* par le fait qu'ils ne possèdent pas de flagelles polaires mais péritriches lorsqu'ils sont mobiles. Les *Bacillus* spp. se distinguent des bactéries déjà mentionnées par le fait que ce sont des bactéries à Gram positif et le fait qu'ils soient capables de sporulation contrairement aux *Lactobacillus*. Les genres *Clostridium* et *Bacillus*, qui sont tous les deux constitués de bacilles à Gram positifs, se distinguent l'un de l'autre par le test de catalase qui est généralement positif pour les *Bacillus* et négatif pour les *Clostridium*. De plus, les *Clostridium* sont capables de croître en anaérobiose, avec production de spores, tandis que les *Bacillus* en sont incapables. Les *Staphylococcus* spp. et les *Streptococcus* spp. se distinguent des autres genres parce qu'ils possèdent une morphologie de coque et que leur Gram est positif. De plus, ils se différencient l'un de l'autre par le test de catalase qui est positif pour les *Staphylococcus* spp. et négatif pour les *Streptococcus* spp. Les *Pasteurella* et les *Actinobacillus* se ressemblent énormément et sont différenciés par les tests de croissance sur MacConkey qui est négatif pour les *Pasteurella* (excepté *P. trehalosi* et *P. aerogenes*) et d'indole qui est négatif pour tous les *Actinobacillus* et par le caractère collant des colonies que forme ce dernier. De plus, les *A. salmonicida*, qui sont aussi MacConkey positif, se distinguent des *Actinobacillus* par le test d'uréase qui est négatif pour *A. salmonicida* et qu'ils ne produisent pas des colonies d'apparence collantes caractéristiques aux *Actinobacillus* (Euzéby, 2003). Les *Flavobacterium* se distinguent des autres genres par leur particularité à produire un pigment jaune à orange. De plus, ils ne possèdent qu'un métabolisme oxydatif et sont non-mobiles. Les

Acinetobacter se distinguent des entérobactéries par leur incapacité à croître en anaérobiose et se distinguent des *Moraxella* par le test d'oxydase qui est toujours négatif pour les *Acinetobacter* et toujours positif pour les *Moraxella*. De plus, les *Moraxella* ont pour particularité d'être incapable de produire des acides à partir des sucres (**annexes 13 et 14**).

Maladies déjà connues affectant les mollusques

Le fait de cataloguer les maladies qui affectent les populations du pétoncle géant (*P. magellanicus*) est tout à fait récent. Ces maladies sont causées par différentes catégories d'agresseurs comme les nématodes, les éponges et les virus. Puisque notre projet est axé sur la découverte d'un agent bactérien pour expliquer le phénomène de mortalité massive, le prochain texte se concentrera sur les maladies causées par les bactéries.

Maladies au Canada et d'intérêt régional

Maladie intracellulaire bactérienne des pétoncles

L'agent causal de la maladie est un procaryote intracellulaire encore non-identifié, probablement un *Mycoplasma* ou une mycobactérie et l'espèce hôte est le pétoncle *Patinopecten yessoensis*. Des études en laboratoire ont indiqué que l'agent pathogène infecte les érythrocytes et que la pathologie est inversement dose dépendante puisqu'une forte dose empêche l'apparition des symptômes par une mort trop rapide. Des pétoncles inoculés de façon intramusculaire avec une forte concentration d'un broyat de tissus provenant de pétoncles malades meurent habituellement d'infections accablantes de deux à quatre semaines après l'injection. Ces infections aiguës sont souvent compliquées par des septicémies secondaires. L'injection de faibles concentrations résultent en une période de prépatence de deux mois et la présence de pustules rose-orangées jusqu'à dix millimètres de diamètre dans le muscle abducteur. Cette maladie semble être associée au stress induit par des méthodes de culture des

pétoncles inappropriées et aucun moyen de prévention ou de contrôle ne sont connus (Bower, 1998).



Figure 2. *Patinopecten yessoensis* (coquille supérieure retirée) démontrant des signes typiques de maladie bactérienne intracellulaire. Notez les dommages de «morsure» à la marge de la coquille (S) et le large pustule (P) dans le centre du muscle abducteur.(Pêche et Océans Canada, 2001)

Abcès bactérien (Brown spot disease)

Cette maladie a été rapportée chez le pétoncle géant de l'Atlantique canadien et de l'est des États-Unis. Il existe une faible prévalence de la maladie chez les pétoncles géants sauvages dans les zones de faible salinité ou dans les estuaires du Canada atlantique. Elle se manifeste sous la forme de larges taches brunes (abcès et nécrose) dans les fibres musculaires ce qui affecte la capacité du mollusque à nager et se refermer. L'agent causal n'a pas encore été déterminé et ce dernier ne semble pas être très contagieux. D'ailleurs, une variété de bactéries ont été cultivées à partir des lésions telles que des bactéries à Gram positif pléomorphes dans le Maine et des *Vibrio* et *Pseudomonas* à partir de pétoncles géants du Golfe St-Laurent (McGladdery et al., 1993; Bower et al., 1994a; Pêches et Océans Canada, 2001; Bower et al., 1994b).

Maladies à signification négligeable au Canada

Chlamydiose

L'agent causal de la maladie affecte les larves et les jeunes pétoncles post-métamorphose de l'espèce *Argopecten irradians*, mais infecterait le diverticule digestif de juvéniles plus âgés et d'adultes. L'agent pathogène provoque la rupture de l'épithélium des glandes digestives causant le dysfonctionnement des procédés métaboliques normaux à une période critique du développement et de la métamorphose larvaire. Au niveau histologique, on observe des sphères amorphes basophiles dans les cellules épithéliales des conduits et tubules digestifs. Puisque les infections aux chlamydies sont ubiquistes, elles ne peuvent être éradiquées. Le seul moyen qui existe pour l'instant est de diminuer la concentration des populations dans un même système d'élevage. Un tel cas de maladie fût rapporté dans une étude échelonnée sur 15 ans portant sur les maladies affectant les pétoncles de baies sauvages et d'élevages de la côte nord-est des États-Unis. Il en a été conclu que l'agent causal de la maladie était bel et bien *Chlamydia* sp. et qu'il infectait les pétoncles du stade larvaire jusqu'au stade adulte. De plus, puisqu'il existait une forte prévalence du procaryote chez les adultes sans qu'il n'y ait d'augmentation du taux de mortalité, l'auteur en conclut que l'exposition à l'agent est commune dans la nature et que les adultes ne sont que des porteurs sains permettant la transmission de la maladie chez les larves durant la fraie puisque c'est seulement ces dernières qui développent des signes cliniques et éventuellement la mort (Bower, 1997; Leibovitz, 1989).

Maladies à organismes ressemblant aux Rickettsies et Chlamydies

Ce sont des procaryotes intracellulaires qui infectent, par endocytose, les cellules épithéliales des branchies et de la glande digestive ce qui causerait des mortalités massives. La maladie se transmet de génération en génération durant la fraie par expulsion des corps élémentaires des diverticules digestifs et infectent celles des larves en développement. Dans l'Atlantique canadien, ces microorganismes ont été retrouvés chez le pétoncle géant et chez d'autres espèces de bivalves telles que les palourdes *Mya arenaria*, les huîtres *Crassostrea virginica* et *Ostrea edulis*, les moules bleues *Mytilus edulis* et les pétoncles *Chlamys islandicus* et *Argopecten irradians*. Or, aucun cas de

mortalité massive n'a été recensé dans l'Atlantique canadien contrairement aux cas de mortalités massives en Europe du pétoncle de mer *Pecten maximus* et ceux du pétoncle de baie *Argopecten irradians* d'un élevage de l'est américain. Pour ce qui est des cas de maladies aux rickettsies, un cas a été recensé dans la baie de Willapa dans l'état de Washington où les spécimens de *Tapes japonica* et *Patinopecten yessoensis* étaient infectés au niveau des cellules épithéliales branchiales. Un autre cas a été reporté dans l'estuaire Nianpique aux États-Unis chez le pétoncle de baie *Argopecten irradians*. Des inclusions basophiles ont été retrouvées dans les cellules épithéliales du rein chez des pétoncles de différentes générations ce qui provoque la lyse des cellules hôtes pour permettre le relâchement des rickettsies. Or, il semblerait que dans ces cas-là, le phénomène ne provoque pas de réponse immunitaire de l'hôte exceptée une inflammation des cellules épithéliales infectées tel que rapporté par Gulka (1983) d'une infection aux rickettsies dans le pétoncle géant *Placopecten magellanicus*. Ils ont suggéré que la myodégénération accompagnant l'infection causerait la mortalité massive de la population du pétoncle géant, mais il s'avéra en fait que ces mortalités étaient causées par d'autres facteurs environnementaux défavorables (McGladdery et al., 1993; Morrison et Shum, 1982; Morrison et Shum, 1983; Elston, 1986; Bower et al., 1994a; Gulka et al., 1983; Bower, 2004).

Nécrose bacillaire (bacillary necrosis)

Suite à une exposition de quatre ou cinq heures à l'agent pathogène, on observe l'apparition de la maladie. Celle-ci provoque une réduction de la capacité de nager et une nage anormale incluant des modèles de «flip-flop», renversés et de rotation rapide («spinning»), des modèles anormaux et une cessation de l'alimentation, et une tendance pour plusieurs larves à être inactives avec le pied rudimentaire et le velum étendus dus au détachement du muscle rétracteur. Des foyers discrets de «swarming» bactériens apparaissent simultanément sur les larves. Ces «swarming» sont des signes de nécrose bacillaire même si les larves semblent autrement tout à fait normales. Le «swarming» devient de plus en plus dense et ubiquiste et après huit heures d'exposition à l'agent pathogène, la mort accompagnée de nécrose granulaire est étendue à toute la population de larves. Au niveau histologique, on observe une forte invasion et prolifération

bactérienne accompagnée d'une destruction cellulaire généralisée causée par la libération d'exotoxines. L'agent causal de la maladie est un petit bâtonnet à Gram négatif légèrement recourbé ou droit possédant une flagellation polaire monotriche dans un milieu liquide. Les colonies qu'il produit sont lisses, blanchâtre à grises, plates à convexes, translucides devenant opaques avec l'âge de la culture, entière et non pigmentées. Les tests suivants sont négatifs : croissance sans NaCl, avec 8% NaCl, à 42°C, fermentation du lactose, du xylose, utilisation du citrate, LDC et ODC. Les tests suivants sont positifs : croissance avec 3% NaCl, avec 6% NaCl (variable), à 25°C, à 37°C (variable), fermentation du glucose, du sucrose, du maltose, hydrolyse de l'amidon, oxydase, catalase (variable), lipase, ADC et liquéfaction de la gélatine. Cette bactérie pathogène ferait partie de l'espèce *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio tubiashii* (avait été autrefois identifié comme faisant parti de l'espèce *Listonella anguillarum*) et *Vibrio* sp. Finalement, puisque les *Vibrio* sont ubiquistes, l'éradication est impossible. Ainsi, le meilleur moyen de prévenir l'infection est d'avoir de bonnes conditions de culture et de vérifier la qualité des algues et de l'eau fournies aux mollusques. (Euzéby, 2003; Bower et al., 1994c; Tubiash et al., 1965; Tubiash et al., 1970; Elson et Leibovitz, 1980)

Aspect de la maladie affectant le Pétoncle géant de la Basse Côte-Nord

La première caractéristique d'un pétoncle moribond est la rétraction de la frange du manteau et un muscle faible qui laisse les coquilles du pétoncle constamment entrouvertes. Les taux de mortalité enregistrés depuis 1993 ont parfois atteint 80% de la population d'un gisement. Un taux élevé d'infection a été détecté à l'examen histopathologique en 1993. Toutefois, celles-ci ne semblaient pas être liées aux mortalités massives puisqu'elles avaient déjà été observées chez des pétoncles sur d'autres gisements du Golfe St-Laurent et ne présentaient aucun impact majeur sur la survie des populations.

Article 1

Bacteriological study on the mass mortalities of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*

Cardin, S., Messier, S., Fortin, M., Fournier, M., Fortier, M., Uhland, F.C.

Département de pathologie et de microbiologie,
Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal,
Case postale 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6

ABSTRACT

Since 1993, episodes of mass mortality of the sea scallop *Placopecten magellanicus* have been recorded in the Lower North Shore, Quebec, Canada. Previous studies conducted by Papatshe inc. were not able to determine the cause of mortalities. In the present study, bacteriological identification of the flora of healthy and moribund juvenile sea scallops from the Lower North Shore and healthy juvenile sea scallops from the Magdelan Islands was undertaken via biochemical tests, 16S rRNA sequencing and gas chromatography. No significant statistical differences were found between flora of healthy and moribund scallops of the Lower North Shore, but differences were noted between flora of healthy scallops from the Magdelan Islands and the Lower North Shore. Phagocytosis assays were then performed to determine the status of the immune system of the scallops of Lower North Shore in comparison with scallops of the same genetic lineage from Nova Scotia, where no cases of mass mortality have been reported. Surprisingly, the percentages of phagocytosis were in general significantly higher in Lower North Shore scallops than in Nova Scotia ($P < 0.0001$) and significantly lower in September than in August and October ($P < 0.0001$). There were no differences between August and October ($P = 0,11$). The significance of these results is herein discussed.

Keywords : Mass mortality, scallop, *Placopecten magellanicus*, flora, phagocytosis.

Abbreviations :

ATCC : American Type Culture Collection

MB : Marine broth

MA : Marine agar

PCR : Polymerase chain reaction

ppt : parts per thousand

TSA : Tryptic soy agar

TSB : Tryptic soy broth

TSI : Triple sugar iron

INTRODUCTION

Over the last decades, aquaculture has been developing worldwide in a phenomenal way. This industry represents an economic activity of several millions of dollars for some countries like Canada, Japan, China, Chile and Peru (Dadswell, 2000). Like other aquaculture sectors, it has also encountered some problems such as bacterial and parasitic diseases just to name two. Among bacterial diseases known to afflict canadian scallops, there are two categories: those of regional concern and those of negligible significance. Intracellular bacterial disease and bacterial abscess lesions are included in the first category while chlamydiosis, *Rickettsia*-like and *Chlamydia*-like organisms and larval vibriosis are found in the second category. Intracellular bacterial disease is caused by an unidentified intracellular prokaryote, possibly a *Mycoplasma* or mycobacterium. Visible symptoms include the development of pinkish-orange pustules up to 10 mm in diameter in the soft tissues and possibly lack of growth and concholin deposition in patches along the edge of the shell (Bower, 1998). Bacterial abscess lesions, also known as brown spot, result from an infection by a Gram-positive bacteria that can cause visible brown spots (abscesses) up to 3 mm in diameter on the abductor muscle, making scallops unfit for the market (Bower, 1994). Chlamydiosis affects larval and adult *Argopecten irradians*. In larvae and post metamorphic juveniles, it causes the disruption of the digestive gland epithelia, causing dysfunction of normal metabolic processes at a critical period of larval development and metamorphosis, leading to an eventual death. Adult scallops are consider as carriers allowing the transmission of the infection to larvae during the spawning period since only these will develop clinical signs (Bower, 1997; Leibovitz, 1989). *Rickettsia*-like and *Chlamydia*-like organism infections are intracellular prokaryote colonization, via endocytosis, of the epithelial cells of the gills and digestive gland. This results in myodegeneration during the spawning period by expulsion of the elementary bodies of the digestive diverticula allowing transmission of the disease to larvae in development. It was once thought to cause mass mortalities (Gulka, 1983), but now they are only considered as infections, usually of light intensity and not associated with disease (Bower, 2004). Larval vibriosis, also called bacillary necrosis, can be noticed by a reduction of motility and abnormal swimming patterns, abnormal patterns of and ceasing of food intake, and a

tendency for many larvae to lie with either their rudimentary foot or velum extended due to the detachment of the retractor muscle (Tubiash, 1965; Elson and Leibovitz, 1980). These symptoms are associated with a systemic infection of the soft-tissues of the larvae by *Vibrio* spp., resulting in tissue necrosis, due to production of an exotoxin by the bacteria, ultimately resulting in the death of the mollusc (Bower, 1996).

Since 1993, massive and seasonal mortalities have been recorded each year in Lower North Shore, Quebec, Canada. Histological exams were done but were unable to identify the presence of a specific agent to explain the phenomenon. The research group Papatshe inc. then conducted challenge tests with homogenates of moribund scallop tissues. These were followed by virological and histological examinations. Their conclusions were that scallops from the Lower North Shore are : (1) more susceptible to stress than scallops from Gaspésie and Magdalen Islands, (2) carriers of a pathogenic agent of bacterial origin, (3) this pathogenic agent could not be identified by conventional histological methods and (4) to identify and characterise this pathogenic agent, other techniques should be used including the identification of the normal bacterial flora.

Based on these conclusions, we hypothesised that the cause of massive and seasonal mortalities of the sea scallop *Placopecten magellanicus* recorded in Lower North Shore is of bacterial origin. To achieve the main goal, that is to identify the causal agent, identification of the scallop's normal flora will be done which will be compared to that of moribund scallops. The immune system will also be evaluated by phagocytosis assays to determine if it has any implication in the problem.

MATERIALS and METHODS

***Placopecten magellanicus* stocks.** During the first year of bacteriological identification, 50 healthy juvenile sea scallops were obtained from the PEC-Nord inc. stocks grown in the Magdelan Islands in August, September and October, and for the second year, a total of 20 healthy juvenile sea scallops and 20 moribund juveniles sea scallops were obtained from the Lower North Shore's Jacques Cartier Bay in September and October. For the immunological tests, 45 juvenile sea scallops from Lower North Shore and 45 juvenile sea scallops from Nova Scotia PEC-Nord stocks, derived from the same genetic stock, obtained in August, September and October were tested.

Bacterial strains and growth conditions. Bacterial cultures were obtained from three sites in the scallop : the gills, the muscle and the digestive gland. These organs were also aseptically removed and homogenated together with a Stomacher 400 (Seward) for 60 seconds. A sterile swab inserted in the gills and digestive gland was plated on two Marine Agar (MA) (BD, Oakville, ON., Canada). One of the plates was incubated at room temperature in aerobic conditions for 48-72 hours and the other one in anaerobic conditions for one week. A sterile swab was inserted in the homogenized material and plated on MA (BD) and incubated at room temperature and at 15°C (only the second year) in aerobic conditions for 48-72 hours and in anaerobic conditions for one week. The swabs from the muscle were first enriched in Marine Broth (MB) (BD) at room temperature in aerobic conditions for 48-72 hours and in anaerobic conditions for one week and afterwards, they were grown on MA (BD) at room temperature in aerobic conditions for 48-72 hours and in anaerobic conditions for one week as described by Withman (2004). After incubation, isolates were selected from primary plates by colony appearance, color and shape. The isolates demonstrating similar traits were collected once from each scallop. The selected isolates were purified by passage on MA (BD) and grown in the same conditions as mentioned above. Afterwards, strains were chosen on their results to the basic tests (Gram coloration, oxidase, catalase, oxydative / fermentative metabolism and mobility) and stored at -70°C in tryptic soy broth (TSB) (BD) with 15% glycerol (Fisher Scientific Company, Ottawa, ON, Canada) until needed.

Biochemical tests. All tests were done at room temperature (except for the strains that were isolated at 15°C) and incubated for 48 hours. The strains isolated were first tested for Gram stain, mobility, oxydative / fermentative metabolism with Triple Sugar Iron agar (Oxoid, Nepean, ON, Canada) supplemented with 2% NaCl (v/v) (Fisher) (TSI+NaCl), oxydase with the Oxydase dryslide (Fisher) and catalase with one drop of 3% peroxyde on a microscope slide. Afterwards, the strains from the first year were, for a better identification, tested for NaCl tolerance with tryptic soy agar (TSA (already have 0,5% of NaCl)) (TSA blood agar base (BD) + 5% sheep blood) and TSA + 8% NaCl (v/v) (Fisher), for citrate degradation on Petri dish (Simmon's citrate medium (Quélab, Montreal, QC, Canada)) inoculated with a replicator, for urea utilization on Petri dish (Seakem ME agarose, Urea agar base (BD), 2% NaCl (Fisher)) inoculated with a replicator, for growth temparture on MA (BD) at room temperature, 35°C and 40°C, for resistance to the vibriostatic agent 0129 (150 µg disc, Oxoid) (only the strains thought to be *Vibrio* or *Aeromonas*), for nitrate utilization (Nitrate broth (BD) + 2% NaCl (v/v) (Fisher)), for lysine (Lysine decarboxylase broth (BD)) and ornithine decarboxylase and arginine dihydrolase (Møeller decarboxylae base (Quélab) + 2% NaCl (v/v) (Fisher) + 1% amino acid (BD)), for carbohydrates fermentation on Petri dish (Phenol Red (ICNBiomedicals, Aurora, OH, USA)+ 15% Agar (v/v) (BD) + 2% NaCl (v/v) (Fisher) + 1% carbohydrates (BD) (v/v) (except salicin 0,5%)) inoculated with a replicator and for cabohydrate assimilation on Petri dish (Carbon Assimilation medium (3.2% Agar (BD) + 1% carbohydrates (BD) (v/v) (except salicin 0,5%) + 0,5% NaCl (Fisher) + 0,1% NH₄H₂PO₄ (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA) + 0,1% K₂HPO₄ (Fisher) + 0,01% MgSO₄ 7H₂O, anhydrous (Fisher)) + 2% NaCl (v/v) (Fisher)) inoculated with a replicator. For all the tests, the following control strains were used : *Listonella anguillarum* 1 U1622-00(A), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, *Vibrio vulnificus* ATCC 33147, *Yersina ruckerii* ATCC 27473, *Stenotrophomas maltophila* ATCC 13637, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Aeromonas salmonicida* ATCC 14174 and *Bordetella bronchiseptica* ATCC 19395.

DNA extraction and PCR. The DNA extraction was done with the QIAamp DNA extraction kit and the QIAquick PCR purification kit was used for the purification of the amplified fragments. The primers used for the amplification were 27F and 519R.

Gas Chromatography. All the samples were prepared for gas chromatography as described in the MIDI inc. system general procedures manual and processed on an HP 6890 Series GC System. Briefly, MB (BD) was inoculated from frozen strains in TBS (BD) + 15% glycerol (Fisher) and incubated from 24 hours to three days at room temperature in aerobic conditions. It was then followed by the inoculation of MA (BD) incubated for 48h in the presence and absence of oxygen. The remaining procedure follows the protocol as described by MIDI inc. system operating manual. Empty tubes were used as negative control and a strain of *Stenotrophomas maltophila* ATCC 13637 as the positive control with each extraction.

Phagocytosis. The hemolymph was obtained from the nonstriated muscle of 45 juvenile sea scallops from Lower North Shore and 45 juvenile sea scallops from Nova Scotia using a 23g needle and 3cc syringe. The hemolymph was transferred to FACSCAN vial and preserved on ice (Anderson, 1992). For each sample, cell counts and evaluation of viability was done with trypan blue diluted 1/10 with deionized water. Cell concentrations were then adjusted to 1×10^6 cells/mL with artificial sea water 32 ppt (sea water salts (Instant Ocean, Aquarium Systems inc., Mentor, OH, USA)+ distilled sterile water). One hundred μL of hemolymph was placed in microplate well in duplicate and fluorescent microbeads of 1,716 μm in diameter (Polysciences, Washington, PA, USA, #17687-5) were added to obtain a ratio of 30 microbeads per hemocyte. The microplate was centrifugated at 1250 rpm for 5 minutes at 4°C , to increase contact between hemocytes and beads and to reduce cells aggregation (Auffret and Oubella, 1997). The microplate was then incubated in complete darkness at room temperature for 18 hours. After incubation, the supernatant and non phagocytized beads were eliminated by inversion. Two hundred μL of fixing solution (0,2% azide sodium (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) + 0,5% formaldehyde (Sigma-Aldrich) + FACS flow (BD)) was then added to each pellet and the fluorescence was read immediately with the cytometer at 520 nm (Blaise, 2002).

Statistics. For comparison of the flora of the healthy and moribond scallops from the Lower North Shore, and with healthy scallops from Magdalen Islands, the Cochran-Mantel-Haenszel test was used at a 5% level of significance to determine if there were statistical differences between the medians of the identifications found in the flora and if those differences were caused by the site or the time of sampling. The Least Square Mean was used to determine significant differences in phagocytic capacity between sites and the Tests of Fixed Effects was performed to detect interactions between the time and the site of sampling.

RESULTS

Bacterial flora compositions

In the moribund scallops of the Lower North Shore, we found eight different bacterial types. They were in decreasing order of relative frequency: *Vibrio*, *Pseudoalteromonas* / *Pseudomonas* / *Alteromonas* and *Shewanella*, *Psychrobacter*, *Colwellia*, marine bacteria, *Flavobacterium* and *Psychromonas*. As for the seven bacterial types in the healthy scallops of Lower North Shore, the decreasing order of relative frequency is: *Vibrio*, *Pseudoalteromonas* / *Pseudomonas* / *Alteromonas*, *Psychrobacter*, *Flavobacterium* and *Shewanella*, *Colwellia* and marine bacteria. The bacterial flora of moribund scallops is composed of Gram negative fermentative rods (46,38%) and of Gram negative oxidative rods (50,73%). As for the bacterial flora of healthy scallops, the percentages are 52,24% and 46,27% respectively. No gram positive organisms were isolated.

In the healthy scallops from the Magdalen Islands, 32 bacterial types were recovered and the more important, in decreasing order of relative frequency, are: *Vibrio* (35%), *Bacillus* (12,78%), *Shewanella* (10,56%), *Roseobacter* (5,56%), *Flavobacterium* (including *Cytophaga*)(5%) and Marine bacterium (5%), and Uncultured Flavobacteriaceae / Bacteroidetes bacterium (4,45%). The other 24 bacterial types identified were present in less than 2%.

Statistical comparison of flora compositions

Since the quantity of each strain was evaluated semi-quantitatively with an ordinal scale, the medians were used, instead of the means, to evaluate the presence of a significant statistical difference between moribund and healthy scallops. Because the identifications Marine bacterium and *Psychromonas* were recovered infrequently during this experiment they were not considered. No significant difference between the flora of moribund and healthy scallops was detected with the Cochran-Mantel-Haenszel test ($P > 0,05$).

Comparison of phagocytic capacities

The linear model with the month and site as factors between subjects indicates a significant effect of the site when all the months are considered together ($P < 0.0001$) and a significant effect of the month when all the sites are considered together ($P < 0.0001$). This means that the phagocytic activity for the scallops of the Lower North Shore was higher than for the scallops of Nova Scotia when all months are considered together, and significantly lower in September than in August and October ($P < 0.0001$). There was no difference between August and October ($P = 0,11$) when all the sites are considered together. Moreover, the statistical analyses showed a near significant interaction between site and month on phagocytic activity ($P = 0,08$) indicating that phagocytosis was significantly higher in Lower North Shore than in Nova Scotia scallops in August ($P = 0,0006$) and October ($P = 0,01$) but not in September ($P = 0,37$).

Discussion and conclusion

The main goal of this study was to identify the bacterial cause of the mass mortalities of the giant scallop *Placopecten magellanicus* recorded in Lower North Shore. To do so, we compared the bacterial flora of the healthy and moribund scallops. Also, we evaluated the scallop's immune system with phagocytosis assays in microplates.

Bacterial flora compositions

The sea scallop is an animal that feeds itself by water filtration and its digestive system flora contains bacteria coming from sea water, the sediments and the continent. In his study, Sakata (1989) stated that the general composition of the normal microflora of the digestive tract of marine molluscs contained *Vibrio* and *Pseudomonas* as the predominant gender. Hariharan and *al.* (1995) discovered in their study that 76% of the recovered bacteria of oysters and mussels were aerobic and 24% anaerobic. Moreover, 68% of the aerobic bacteria were Gram negative and they recovered the following genders, by descending order of frequency: *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* / *Shewanella*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp. and *Streptococcus* spp. In regards to the anaerobic bacteria, 72% were Gram positive and included, by descending order of importance, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium sporogenes*, *Bacteroides buccae*, *Fusobacterium mortiferum* and *Clostridium bifermentans*. As for Otta and *al.* (2001), they determined the flora of untreated sea water and concluded that *Vibrio* was the main gender followed by *Pseudomonas* and *Bacillus*. The remainder of the flora was composed of *Moraxella*, *Acinetobacter* and *Aeromonas*. In its study on the detection of *Vibrionaceae* in mussels, Croci's team (2001) isolated, by descending order of importance, the genders *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Pasteurella* and *Ochrobactrum*, and *Agrobacterium*. Moreover, *Vibrio alginolyticus* followed by *Aeromonas salmonicida* and *Aeromonas hydrophila/caviae* were the species most frequently isolated in this experiment. In their study, Waechter and *al.* (2002) isolated three principal genders

from moribund seed oysters *Crassostrea gigas*: (1) strains related to the group *Cytophage / Flavobacterium*, (2) strains related to the gender *Agrobacterium*, and (3) strains related to *Vibrio* species.

As seen in the previous studies, in the present experiment, *Vibrio* is also the dominant gender in the scallops of Lower North Shore and Magdelan Islands. It is interesting that no Gram-positive nor strict anaerobic bacteria were found in the scallops of the Lower North Shore, contrary to what is described in the literature and the results from the Magdelan Islands scallops, in which *Bacillus* was the second most important genus. One of the reasons that could explain the absence of those types of microorganism in Lower North Shore is the weak water and sediment contamination with terrestrial bacterium from human activities (agriculture, industries, wasted water) or ground erosion. Another possibility would be that the environmental conditions prevailing in Lower North Shore are not suitable for the growth of this type of microorganism. Moreover, no *Aeromonas* were isolated from the flora of the scallops of the Lower North Shore and the Magdelan Islands contrary to the studies of Sakata (1989), Hariharan (1995), Dumontet (2000), Otta (2001) and Croci (2001). Even if it is frequent to find this genus in the seafood, the water salinity prevailing in Lower North Shore and the Magdelan Islands is perhaps too high to allow the growth of *Aeromonas* sp. Indeed, this genus is unable to grow at salt concentrations as high as *Vibrio* sp., which require, for the majority, the presence of these salts to survive. Another interesting fact is that the specie *Roseobacter gallaeciensis*, known to be a probiotic for scallop larvae (Ruiz-Ponte, 1999), is only found at the Magdelan Islands. It was shown *in vitro* that *R. gallaeciensis* was antagonistic to certain mollusc's pathogens such as *Vibrio* spp and that this inhibitory effect was only displayed in the presence of the pathogen. The authors thought that the antibacterial activity of *R. gallaeciensis* was induced by a protein released by the pathogen. Also, the addition of *R. gallaeciensis*' cell extract in the larval cultural tanks significantly enhanced scallop larval survival, thus demonstrating its probiotic effect. Moreover, there are four times less genera in the Lower North Shore scallops than in Magdelan Islands. This may be due to adverse environmental factors affecting bacterial growth such as lower water temperature, salinity differences or the presence of pollutants. Conversely, the presence of an

important human population may explain the large variety of bacterial genera found in Magdalen Islands.

If we compare the relative frequency, we would conclude that there is a significant statistical difference between moribund and healthy scallops of Lower North Shore for the genus *Psychrobacter*, *Shewanella* and *Vibrio*. But those percentages only consider presence or absence of the bacteria in the scallops without considering the quantity. Since a semi-quantitative system was used, medians were compared to determine the presence of a significant difference. No significant difference was found. At this point we were unable to identify a specific bacterial agent as the cause of the massive and seasonal mortalities of the sea scallop *Placopecten magellanicus* recorded on the Lower North Shore.

Phagocytosis assays

Papathse inc. had concluded in their studies that scallops from the Lower North Shore are more susceptible to stress than those from other geographical regions. Stressors of various types have been shown to have an affect on phagocytic activity in shellfish. In our study, the phagocytic activity is generally higher in the scallops originating from Lower North Shore as compared to those from Nova Scotia. It has been shown that the heterocytes of shellfish exposed to low concentrations of heavy metals demonstrate an elevated phagocytic activity, whereas higher levels act in an inhibitory manner (Sauvé, 2002; Cheng and Sullivan, 1984). A drop in phagocytic activity was also observed during the month of September in both the Lower North Shore and Nova Scotia sites. The reproduction period for shellfish in these regions takes place from the middle of August to the middle of September and is generally recognized as a demanding physiological period. This indicates that this common stressor likely affects the scallops in the same manner, even though located in different regions. This also supports the possible role of stress in the differences of phagocytic activity observed between the two sites. It would be interesting to evaluate the phagocytic capacities of the scallops over a one year period to determine if the immune system of the scallops from Lower North Shore is different from other sites and investigate its implication in the

mass mortalities. A more exhaustive study of the culture environment would be necessary to identify the factors responsible.

Table I : Relative frequency of the bacterial types found in the moribund and healthy scallops of Lower North Shore.

Bacterial types	Moribunds	Healthy
<i>Vibrio</i>	40,6	49,3
<i>Shewanella</i>	20,3	4,5
<i>Pseudoalteromonas / Pseudomonas / Alteromonas</i>	20,3	19,4
<i>Psychrobacter</i>	8,7	17,9
<i>Colwellia</i>	4,4	3,0
<i>Marine bacterium</i>	2,9	1,5
<i>Flavobacterium</i>	1,5	4,5
<i>Psychromonas</i>	1,5	0

Figure 1 : Comparaison of the medians of the genera found in the moribund and healthy juvenile sea scallops of the Lower North Shore.

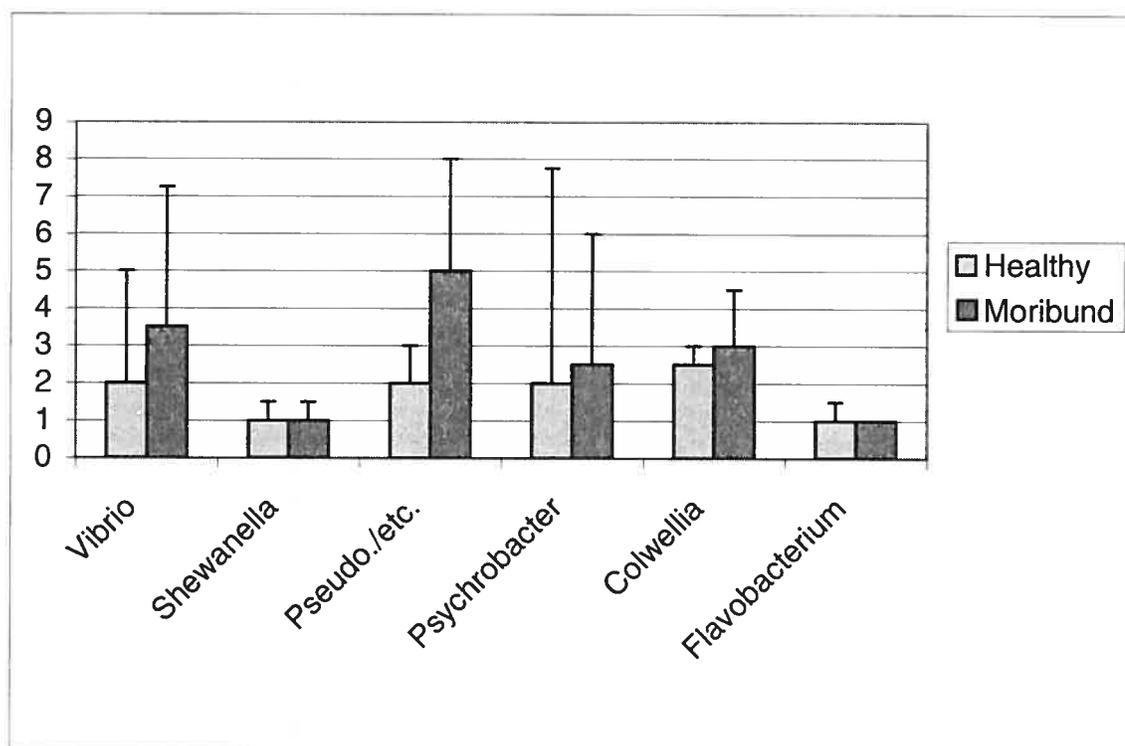
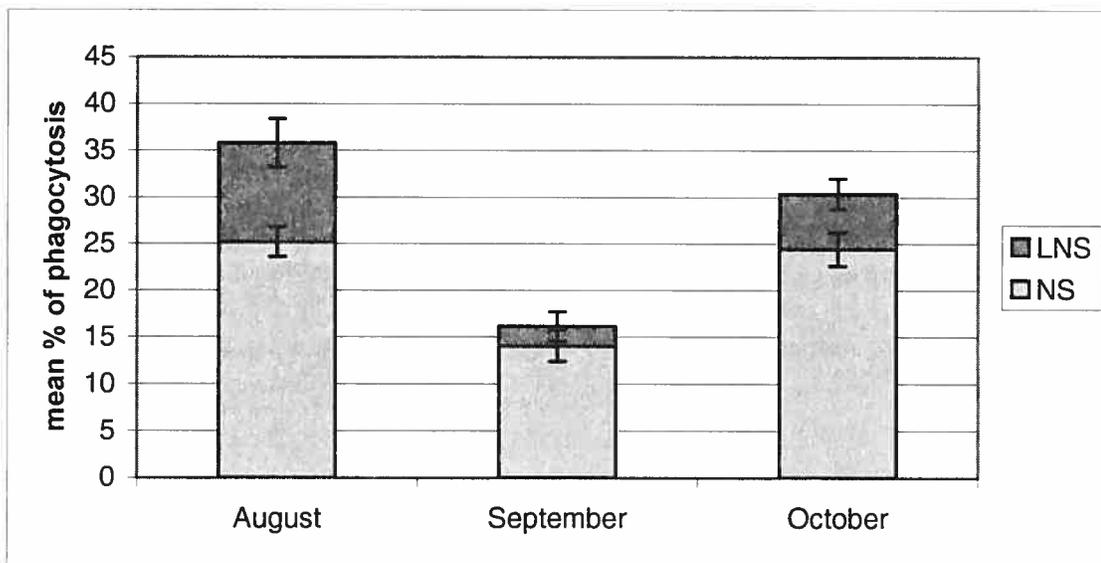


Figure 2 : Comparison of phagocytic capacities of scallops from the Lower North Shore and Nova Scotia for August, September and October.



References

- Blaise, C., Trottier, S., Gagné, F., Lallement, C., Hansen P.D. **2002**. Immunocompetence of bivalve hemocytes as evaluated by a miniaturized phagocytosis assay. *Environ Toxicol.* **17**(3):160-9.
- Bower, S.M. (1998): Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: Intracellular Bacterial Disease of Scallops. http://www-sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/pages/ibdsc_e.htm (05-11-11)
- Bower, S.M. (1996): Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: *Vibrio* spp. (Larval Vibriosis) of Scallops. http://www-sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/pages/vibriosc_e.htm (05-11-11)
- Bower, S.M., McGladdery, S.E., Price, I.M. (1994): Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: Bacterial Abscess Lesions of Scallops. http://www-sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/pages/balsc_e.htm (05-11-11)
- Bower, S.M. (1997): Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: Chlamydiosis of Scallops. http://www-sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/pages/chlamysc_e.htm (05-11-11)
- Bower, S.M. (2004): Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: Rickettsia-like and Chlamydia-like Organisms of Scallops. http://www-sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/pages/rlclose_e.htm (05-11-11)
- Cheng, TC et Sullivan, JT. **1984**. Effects of heavy metals on phagocytosis by molluscan hemocytes. *Marine Environmental Research* **14**: 305-315.
- Croci, L., Serratore, P., Cozzi, A., Milandri, S., Suffredini, E. et Toti, L. **2001**. Detection of Vibrionaceae in mussels and in their seawater growing area. *Letter in Applied Microbiology.* **32**: 57-61.
- Dadswell, M. 2000. Pragmatic approaches to the culture of sea scallops : a review of the situation in Atlantic Canada. *Aquaculture Canada 2000 abstracts.* <http://www.aquacultureassociation.ca/abst2000/scallop.html#dadswell> (05-12-19)

- Dumontet, S., Krovacek, K., Svenson, S.B., Pasquale, V., Baloda, S.B. et Figliuolo, G. **2000**. Prevalence and diversity of *Aeromonas* and *Vibrio* spp. in coastal waters of Southern Italy. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* **23**: 53-72.
- Elson, R. and Leibovitz, L. 1980. Detection of vibriosis in hatchery reared larval oysters: correlation between clinical, histological and ultrastructural observations in experimentally induced disease. *Proceedings of the National Shellfisheries Association.* **70**(1): 122-123.
- Gulka, G., Chang, P.W. et Marti, K.A. **1983**. Prokaryotic infection associated with mass mortality of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *J. Fish Diseases.* **6** : 355-364.
- Hariharan, H., Giles, J.S., Heaney, S.B., Arsenault, G., McNair, N. et Rainnie, D.J. **1995**. Bacteriological studies on mussels and oysters from six river systems in Prince Edward island, Canada. *J. Shellfish Research.* **14**(2): 527-535.
- Leibovitz, L. **1989**. Chlamydiosis: a newly reported serious disease of larval and postmetamorphic bay scallops, *Argopecten irradians* (Lamarck). *Journal of Fish Diseases.* **12**: 125-136.
- Otta, S.K., Karunasagar, I. et Karunasagar, I. **2001**. Bacteriological study of shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius, hatcheries in India. *J. Appl. Ichthyol.* **17**: 59-63.
- Ruiz-Ponte, C., Samain, J.F., Sánchez, J.L., Nicolas, J.L. **1999**. The benefit of a *Roseobacter* species on the survival of scallop larvae. *Marine Biotechnology* **1**: 52-59.
- Sakata, T. **1989**. Microflora of healthy animals. In : *Methods for the microbiological examination of fish and shellfish.* (ed. par: Austin, B. et Austin, D.A.). Ellis Horwood Limited: Chichester, England. 317 pp.
- Sauvé, S., Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Senécal, L., Goudreau, P., Fournier, M. **2002**. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (AG, CD, Hg and Zn). *Aquatic Toxicology.* **58**: 189-200.
- Tubiash, H.S., Chanley, P.E. et Leifson, E. **1965**. Bacillary Necrosis, a Disease of Larval and Juvenile Bivalve Mollusks. 1. Etiology and Epizootiology. *Journal of Bacteriology.* **90**(4): 1036-1044.

- Waechter, M., Le Roux, F., Nicolas, J.-L., Marissal, É. et Berthe, F. **2002**.
Caractérisation de bactéries pathogènes de naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas*. C.R. Biologies 325. 231-238.
- Whitman, K.A. **2004**. Finfish and Shellfish Bacteriology Manual: Techniques and Procedures. Iowa State Press. Ames: Iowa. pp.258 (Blackwell Publishing Company)

Acknowledgments

This work was supported by grants from RAQ and the Ministère de l'Agriculture, Pêcheries et Agriculture du Québec. We thank Dr Guy Beauchamp for his great help for the statistical analysis and Sophie Gauthier-Clerc and Marlène Fortier for their technical assistance on this project.

Discussion générale

L'objectif principal du présent projet était d'identifier l'agent causal d'origine bactérienne des mortalités massives et saisonnières du pétoncle géant *Placopecten magellanicus* de la Basse Côte-Nord. Pour ce faire, nous avons comparé la flore des pétoncles sains avec celle des pétoncles moribonds. Nous voulions aussi évaluer l'état du système immunitaire des pétoncles à l'aide d'un test de phagocytose de billes de latex fluorescentes en microplaque.

Flore bactérienne du pétoncle géant

En comparant les flores décrites dans la littérature et celles des pétoncles de la Basse Côte-Nord (BCN) et des Îles de la Madeleine (IM), nous remarquons quelques faits intéressants. Tout d'abord, le genre dominant est le même, soit *Vibrio*. Fait surprenant, aucune bactérie à Gram positif ou anaérobie stricte n'a été récupérée à partir des pétoncles de la BCN contrairement à certaines études précédentes (Hariharan, 1995; Otta, 2001), tandis qu'aux IM, le genre *Bacillus* est le second genre en importance. Une des raisons qui pourrait expliquer l'absence des bactéries à Gram positif et anaérobies strictes en BCN est qu'il n'y aurait pas ou très peu de contamination de l'eau et des sédiments marins par des bactéries dites terrestres provenant de l'activité humaine (agriculture, industries, eaux usées) ou de l'érosion des sols. Une autre possibilité serait que les conditions environnementales prévalant en BCN sont défavorables à la croissance de ce type de microorganisme. De plus, aucun *Aeromonas* n'a été trouvé dans les flores des pétoncles de la BCN et des IM contrairement aux études de Sakata (1989), Hariharan (1995), Dumontet (2000), Otta (2001) et Croci (2001). Même si on retrouve fréquemment ce genre dans les fruits de mer, la salinité de l'eau en BCN et aux IM serait peut-être trop élevée pour permettre la croissance des *Aeromonas* sp. En effet, ce genre ne croît pas à des concentrations en sels aussi élevées que les *Vibrio* sp., qui nécessitent, pour la plupart, la présence de ces sels pour survivre. Autre fait intéressant, l'espèce *Roseobacter gallaeciensis*, dont les propriétés probiotiques pour les larves de pétoncles ont déjà été prouvées (Ruiz-Ponte, 1999), n'est retrouvée qu'aux IM. En effet, il a été démontré *in vitro* que *R. gallaeciensis* produisait une molécule qui inhibait la

croissance de plusieurs bactéries pathogènes, dont les *Vibrio* sp. Le relâchement de cette molécule ne se faisait qu'en présence de la bactérie pathogène car il serait induit par la présence d'une protéine dans le milieu relarguée par la bactérie pathogène. De plus, l'ajout d'extrait cellulaire de *R. gallaeciensis* dans les bassins de culture des larves de pétoncle a significativement amélioré la survie de ces dernières, prouvant l'effet probiotique. On retrouve quatre fois moins de types bactériens en BCN qu'aux IM, probablement dû à la présence d'une plus faible population humaine ou encore à des facteurs environnementaux défavorables tels qu'une température de l'eau plus froide, une salinité moins adéquate ou la présence de polluants.

Si nous comparons les pourcentages de fréquence des types bactériens retrouvés chez les pétoncles sains et moribonds de la BCN, nous pourrions conclure qu'il y a certainement une différence statistiquement significative pour les genres *Psychrobacter*, *Shewanella* et *Vibrio*. Or, ces pourcentages ne considèrent que la présence ou l'absence du type bactérien dans les spécimens sans tenir compte de la quantité. Puisque nous avons utilisé un système semi-quantitatif (1+ à 4+) pour quantifier chaque de type bactérien, nous avons utilisé les médianes et leurs interquartiles pour comparer les flores des pétoncles sains et moribonds de la BCN et si le temps d'échantillonnage avait un effet quelconque sur celles-ci. Premièrement, aucune différence statistiquement significative n'a pu être établie entre les flores des pétoncles sains et moribonds de la BCN suite aux tests de Cochran-Mantel-Haenszel. De façon générale, nous retrouvons les mêmes isolats dans les branchies, les glandes digestives et les broyats ce qui nous permettrait de n'échantillonner que les branchies pour obtenir la flore totale sans sacrifier l'animal. De plus, le temps d'échantillonnage ne semble pas influencer les flores des pétoncles de façon positive ou négative soit en augmentant ou diminuant le nombre de types bactériens ou encore en augmentant ou diminuant la quantité de bactérie et de façon générale, nous retrouvons les mêmes isolats lorsqu'incuber à 15°C et température pièce.

Phagocytose

Tout d'abord, les pourcentages de phagocytose sont, de façon générale, plus élevés chez les pétoncles de la BCN que ceux de la Nouvelle-Écosse (NE). De plus,

tandis que les pourcentages oscillaient autour des 25-30% aux mois d'août et octobre, nous avons observé une chute abrupte de ces derniers en septembre pour les deux sites. Le fait que les hémocytes des pétoncles de la BCN soient plus actifs que ceux provenant de la NE ne peut être expliqué par un facteur génétique puisque tous les pétoncles sont de la même lignée. Il se pourrait que les pétoncles de la BCN aient à faire face à un plus grand nombre de facteurs stressant, ce qui accréderait notre hypothèse sur la présence de facteurs environnementaux défavorables. Ce facteur provoquerait un stress qui se traduirait, exceptionnellement, par une augmentation de la phagocytose. D'ailleurs, il a été démontré que la présence de polluants métalliques (cobalt (Co), chrome (Cr), cuivre (Cu), fer (Fe), mercure (Hg), étain (Sn) et zinc (Zn)) à faibles concentrations stimule la phagocytose au lieu de l'inhiber (Sauvé, 2002; Cheng et Sullivan, 1984; Blaise; 2002). Malheureusement, nous n'avons pas eu la chance de faire des analyses de l'eau et des sédiments pour confirmer cette hypothèse. Pour ce qui est de la chute des pourcentages de phagocytose enregistrée aux deux sites, elle pourrait être due au stress induit par la ponte qui a lieu de mi-août à mi-septembre car la ponte est reconnue comme un énorme stress qui provoque une réduction de l'activité phagocytaire et permet l'émergence de maladies opportunistes. Or, puisque nos essais ne se sont fait que sur une période de trois mois, nous ne pouvons affirmer que ce phénomène est ponctuel ou récurrent. Ceci démontre que ce stress commun affecte de la même manière les pétoncles même s'ils sont localisés à deux sites différents. Ceci permet aussi de supporter l'hypothèse sur le rôle possible d'un facteur stressant dans les différences observées entre les deux sites pour ce qui est de l'activité phagocytaire.

Élaboration d'un protocole pour l'identification des bactéries retrouvées chez les mollusques

Récupération et isolement

Dans le présent projet, la récupération des bactéries s'est faite en se basant sur la méthode décrite dans le manuel «*Methods for the microbiological examination of fish and shellfish*» (Austin et Austin, 1989), à l'aide de cotons-tiges stériles directement plantés dans les organes (branchies, glandes digestives et broyats formés des branchies,

glandes digestives et muscles) à échantillonner. Les écouvillons ont ensuite servi à ensemer directement les géloses. Pour les muscles, les cotons-tiges ont d'abord servi à ensemer des bouillons puisque le nombre de bactéries s'y trouvant serait vraisemblablement faible. Cette technique fut utilisée car elle semblait la plus efficace pour sa rapidité et sa simplicité. Le fait de broyer chaque organe pour ensuite utiliser cet homogénat pour ensemer les géloses aurait peut-être permis une meilleure récolte de l'ensemble des bactéries, mais lorsque nous constatons à partir de quels organes les différents isolats ont été récupérés (données non fournies), nous pouvons remarquer que les isolats retrouvés dans les broyats se retrouvent aussi dans les branchies et / ou les glandes digestives. Ainsi, seules les branchies ou les glandes digestives auraient pu être échantillonnées ce qui aurait permis d'économiser de temps et du matériel tout en obtenant un aussi bon aperçu de la flore bactérienne. Pour ce qui est du milieu de croissance en gélose, puisque nous nous attendions à obtenir autant des bactéries dites marines que des contaminants terrestres, nous avons d'abord testé trois milieux solides pour déterminer lequel permettrait la meilleure croissance mais surtout la plus variée possible. Ainsi, les milieux gélose sang, gélose sang avec 2% NaCl et Marine Agar 2216 (MA) (BD), qui semblait le milieu le plus complet en électrolytes et le milieu le plus souvent cités dans la littérature concernant la récupération de bactéries marines, furent testés en aérobiose et anaérobiose. Puisque la moitié des bactéries isolées poussaient sur MA mais non sur gélose sang avec 2% NaCl, le milieu MA fût donc sélectionné comme milieu de croissance. Pour ce qui est de la température d'incubation, nous avons opté pour une température approximative de 22°C (température pièce) puisque cette température convenait à la majorité des bactéries qui auraient pu être isolées (Buller, 2004). L'incubation à 15°C fût aussi testée lors des échantillonnages quatre et cinq afin de vérifier si d'autres genres ou espèces de bactérie auraient pu être récupérés à cette température et non à température pièce. À une ou deux exceptions près (*Psychromonas* et souche identifiée comme *Vibrio*), toutes les bactéries isolées à 15°C le furent aussi à température pièce. Ainsi, en se basant sur nos observations, l'incubation devrait se faire à 15°C pour s'assurer de récupérer tous les isolats dans le cas d'étude générale de la flore, tandis que l'incubation à température pièce pourrait être utilisée

pour la recherche spécifique de certains genres puisque cette température permettait d'obtenir des colonies de taille plus grande pour le même temps d'incubation.

Identification des souches récupérées

Puisque nous nous attendions à récupérer majoritairement des *Vibrio* spp. mais aussi des *Aeromonas*, des *Pseudomonas*, des *Staphylococcus*, des *Streptococcus*, des Entérobactéries, des *Shewanella*, des *Flavobacterium*, etc., nous avons commencé avec les tests d'identification au genre généralement utilisés soit la coloration de Gram, les tests d'oxydase et de catalase, le métabolisme fermentatif ou oxydatif via le milieu TSI et la mobilité en milieu Gillies. Or, puisque le milieu Gillies est semi-solide, les souches dites oxydatives ne pouvaient croître qu'à la surface du tube et donc induire de faux-négatifs. Ainsi, nous avons dû opter pour une autre méthode pour évaluer la mobilité, soit la goutte suspendue. Par la suite, des tests en tubes et sur géloses ensemencées à l'aide d'un réplicateur ont été effectués en se basant sur les différents tableaux d'identification retrouvés dans la littérature. Tous les milieux ont été supplémentés avec 2% NaCl pour permettre une meilleure croissance et réduire le nombre de faux-négatif. Pour le test de croissance en présence de l'agent vibriostatique O129 (150 µg), au lieu de faire un tapis bactérien, nous avons fait des stries au travers desquelles nous déposons les disques, tel que recommandé par Withman (2004), mais ces stries étaient difficiles à évaluer. Ceci pourrait expliquer pourquoi nous avons obtenu autant de faux positifs soit une identification comme *Aeromonas* au lieu de *Vibrio*. Ainsi, il serait préférable de faire un vrai tapis bactérien, tel qu'utilisé pour les antibiogrammes, pour diminuer les erreurs d'interprétation. Pour ce qui est du test de Voges-Proskauer, il fût éliminé des tests à utiliser pour l'identification générale puisqu'il était toujours négatif. Ce test ne devrait être utilisé que pour confirmer une identification obtenue avec les autres tests. Pour l'utilisation des hydrates de carbone, les résultats furent très peu concluants, surtout pour les *Vibrio*, puisque dans certains cas il était difficile de déterminer si le test était positif ou négatif. De manière conventionnelle, le milieu aurait dû être déposé en pente dans un tube et c'est peut-être pourquoi la technique sur gélose que nous avons testée n'a pas vraiment fonctionnée ou encore, le fait d'utiliser un réplicateur pour l'ensemencement ne permettait pas d'obtenir un assez grand inoculum pour permettre

une bonne croissance et donc, une bonne lecture. Ainsi, la technique du milieu Assimilation de Carbone sur gélose pourrait quand même être utilisée mais avec un ensemencement par stries avec un coton-tige pour obtenir une meilleure croissance.

Utilisation des autres outils diagnostiques

Pour notre part, nous avons d'abord sélectionné des souches représentatives (environ 180) de l'ensemble des inconnus congelés pour faire leur séquençage ce qui permettrait par la suite de bâtir une banque de données de référence pour la chromatographie en phase gazeuse. Puisque les souches étaient conservées dans du TBS avec 15% de glycérol, nous avons dû faire quelques lavages préalables pour éliminer le glycérol car ce dernier est inhibiteur pour l'amplification. Pour ce qui est du rendement de l'amplification, sur les 180 souches choisies, une cinquantaine n'ont pas pu être amplifiées même si des étapes supplémentaires ont été effectuées pour obtenir une meilleure extraction. Aucune bande sur les gels d'agarose n'est apparue ce qui aurait indiqué la présence du matériel génétique. Pour ce qui est du séquençage de l'ARNr 16S, pour certaines souches celui-ci n'a pas réussi à bâtir de bonnes séquences ou de séquences assez longues pour permettre une identification avec la banque de données retrouvée sur le site de NCBI. Nous ne pouvons expliquer ce rendement douteux car malgré que les souches soient d'origine environnementale, ces techniques ont déjà très bien fonctionné pour des souches du même type. De plus, pour certaines souches, le séquençage ne permettait pas de différencier plusieurs résultats d'identification pour le même inconnu ou encore n'était pas capable d'identifier à l'espèce et même dans certains cas à la famille et au genre. Dans l'article de Paillard et *al.* (2004), il est stipulé que l'analyse des séquences d'ADNr SSU, utilisant des gènes codant pour des protéines, aurait plusieurs avantages sur l'ARNr tels que des niveaux plus élevés de variation séquentielle permettant la différenciation de souches fortement apparentées tandis que l'habileté de traduire l'ADN en séquences de protéine permet l'analyse phylogénétique de souches très peu apparentées et aussi des alignements de séquences plus précis. De plus, puisque des protéines telles que l'ADN gyrase B et le facteur sigma 70 sont ubiquistes puisqu'elles sont essentielles à la croissance des bactéries, elles évoluent beaucoup plus rapidement que l'ADNr et fournissent des résolutions plus élevées que

l'utilisation de séquences d'ADNr 16S. Ainsi, l'utilisation des séquences de gènes codant pour des protéines au lieu de l'ARNr 16S nous aurait probablement permis d'obtenir un meilleur taux d'identification mais pas nécessairement d'amplification.

Lorsque nous avons obtenu les résultats des séquençages, nous avons analysé toutes nos souches congelées par la chromatographie en phase gazeuse en notant l'identification des souches qui avaient été séquencées. Ceci nous permit d'établir une banque de données pour les souches environnementales et un dendogramme pour l'identification de l'ensemble des souches conservées. Sur les 500 souches congelées, seulement une dizaine n'ont pas pu être identifiées car trop peu apparentées aux autres souches. L'utilisation combinée de ces deux techniques nous a permis d'évaluer de façon semi-quantitative la composition bactériologique de la flore des différents organes et spécimens à moindre coût qu'un séquençage de l'ensemble de souches qui ne nous aurait pas nécessairement permis d'obtenir de meilleures identifications. (Voir protocole en **annexe 12**)

Conclusions

L'identification et la comparaison des flores bactériennes des pétoncles géants sains et moribonds de la Basse Côte-Nord ne nous a pas permis de déterminer un agent causal bactérien pour expliquer les mortalités massives et saisonnières enregistrées dans la région.

Nous avons observé que les flores des pétoncles sains et moribonds de la Basse Côte-Nord étaient similaires et que la date à laquelle l'échantillonnage se faisait ne modifiait en rien leurs compositions. Nous avons aussi remarqué que la flore bactérienne des pétoncles provenant des Îles de la Madeleine était beaucoup plus diversifiée dû probablement à un environnement plus favorable à cette diversification. Les informations obtenues sur la composition de la flore bactérienne et les techniques utilisées pour l'identification de cette dernière permettront l'établissement éventuel d'un protocole pour les laboratoires de diagnostic qui travailleront avec des spécimens provenant des industries maricoles. De plus, la composition bactérienne aux différents sites permettra d'utiliser le pétoncle géant comme outil de surveillance de pollution aquatique de toute origine (fécale ou métallique) dûe à l'activité humaine.

L'évaluation de l'état de santé du système immunitaire des pétoncles via la phagocytose en microplaque a permis d'établir que les pétoncles de la Basse Côte-Nord avaient un pourcentage de phagocytose plus élevé que ceux de la Nouvelle-Écosse. Tel que discuté précédemment, ceci pourrait être dû à la présence de polluants métalliques qui, au lieu d'inhiber l'activité phagocytaire, augmente la phagocytose lorsque présents en faibles concentrations. De plus, une forte baisse des pourcentages a été observée aux deux sites au mois de septembre qui pourrait s'expliquer par le stress induit par la ponte qui a lieu dans cette période de l'année. Or, le fait que l'évaluation se soit faite que sur trois mois ne permet pas d'affirmer que cette chute est un phénomène ponctuel ou récurrent. La surveillance des capacités de phagocytose sur une année pourrait servir pour l'éventuelle utilisation du pétoncle géant dans la détection de facteurs environnementaux stressant tel que la pollution de l'eau ou encore dans l'évaluation de l'efficacité d'un processus de décontamination en observant une augmentation de la phagocytose dans le temps.

L'incapacité de trouver un agent bactérien comme cause des mortalités et l'observation d'une phagocytose plus élevée exigent la détermination et l'étude des différentes sources de stress qui pourraient causer les mortalités massives. De plus, puisque l'espèce *Roseobacter gallaeciensis*, reconnue comme étant un probiotique, n'est présente seulement qu'aux Îles de la Madeleine, il serait intéressant d'évaluer le potentiel de l'ensemencement des eaux de culture des larves et des pétoncles juvéniles sur le rendement final de la production.

Bibliographie

- Alsina, M. et Blanch, A.R. **1994**. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J. Applied Bacteriology*. **76**: 79-85.
- Austin, D.A., McIntosh, D. et Austin, B. **1989**. Taxonomy of fish associated *Aeromonas* spp., with the description of *Aeromonas salmonicida* subsp. smithia subsp. nov. *System. Appl. Microbiol.* **11**: 277-290.
- Bain, N. et Shewan, J.M. 1968. identification of *Aeromonas*, *Vibrio* related organisms. *In* identification Methods for Microbiologists (Part B). Gibbs, B.M. et shapton, D.A. (eds). London: Academic Press. pp. 79-84.
- Baumann, P., Furniss, A.L. et Lee, J.V. **1984**. Genus *Vibrio*. *In* Bergey's manual of Systematic Bacteriology, vol.I. R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (eds). Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 518-538.
- Baumann, P. et Schubert, H.W. **1984**. Family *Vibrionaceae*. *In* Bergey's manual of Systematic Bacteriology, vol. I. R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (eds). Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 516-517.
- Baumann, P. et Baumann, L. **1992**. Chapitre 104. The Marine Gram-Negative Eubacteria: Genera *Photobacterium*, *Beneckea*, *Alteromonas*, *Pseudomonas*, and *Alcaligenes*. *In* The Prokaryotes. Vol. I. Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H. (eds). Springer Verlag, New york. pp. 1302-1331.
- Blaise, C., Gagné, F., Pellerin, J., Hansen, P.-D. et Trottier, S. **2002**. Molluscan shellfish biomarker study of the Quebec, Canada, Saguenay fjord with the Soft-shell clam, *Mya arenaria*. *Environmental Toxicology*. **17**(3):170-86.
- Bøvre, K. **1984**. Genus *Moraxella*. *In* Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Vol. I. R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (eds). Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 296-303.
- Bower, S.M. **1998**. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: Intracellular Bacterial Disease of Scallops. <http://www->

- [sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/pages/ibdsc_e.htm](http://www.sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/pages/ibdsc_e.htm). Dernière modification le 2002-12-18. (2004-03-07)
- Bower, S.M. **2004**. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: Rickettsia-like and Chlamydia-like Organisms of Scallops. http://www.sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/pages/rlclose_e.htm (2005-11-11)
- Bower, S.M., McGladdery, S.E., et Price, I.M. **1994a**. Synopsis of diseases and parasites of shellfish. *In* Annual review of fish diseases (ed. par Faisal, M. et Hetrick, F.M). Vol 4. Pergamon. pp106-120.
- Bower, S.M., McGladdery, S.E., Price, I.M. **1994b**. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: Bacterial Abscess Lesions of Scallops. [.http://www.sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/pages/balsc_e.htm](http://www.sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/pages/balsc_e.htm). Dernière modification automne 1994. (2004-03-07).
- Bower, S.M., McGladdery, S.E., Price, I.M. **1994c**. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: *Vibrio* spp. (Larval and Juvenile Vibriosis) of Clams. http://www.sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/pages/vibriocc_e.htm. Dernière modification automne 1994. (consultée le 2004-03-07).
- Bower, S.M. **1997**. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: Chlamydiosis of Scallops. http://www.sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/pages/chlamysc_e.htm. Dernière modification 1997-07-18. (2004-03-08).
- Brenner, D.J. **1984**. Family *Enterobacteriaceae*. *In* Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Vol. I. R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (eds). Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 408-516.
- Brown, C. **1981**. A study of two shellfish-pathogenic *Vibrio* strains isolated from a Long Island hatchery during a recent outbreak of disease. *J. Shellfish Research*. **1**(1): 83-87.
- Buller, N.B. **2004**. Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual. CABI Publishing. Cambridge: Massachusetts. pp. 372 (CAB International)

- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M. et Pruzoo, C. **2002**. Bacteria- hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Techniques*. **57**: 469-476
- Carter, G.R. **1984**. Genus *Pasteurella*. In Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Vol. I. R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (eds). Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 552-558.
- Cato, E.P., George, W.L. et Finegold, S.M. **1984**. Genus *Clostridium*. In Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Vol. II. R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (eds). Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 1141-1200.
- Cheng, TC et Sullivan, JT. **1984**. Effects of heavy metals on phagocytosis by molluscan hemocytes. *Marine Environmental Research* **14**: 305-315.
- CiSMeF. **2005**. Chromatographie en phase gazeuse. CHU de Rouen. <http://www.chu-rouen.fr/ssf/tech/chromatographiephasegazeuse.html> (2005-12-16)
- Claus, D. et Berkeley, R.C.W. **1984**. Genus *Bacillus*. In Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Vol. II. R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (eds). Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 1104-1138.
- Colwell, R.R. and Liston, J. **1962**. The natural bacterial flora of certain marine invertebrates. *J. Insect Pathology*. **4**: 23-33.
- Colwell, R.R. **1984**. Chapter 17 : Tactics for detecting pathogenic vibrios in the environment et Chapter 20 : Identification and classification of Vibrionaceae-- an overview. In *Vibrios in the environment*. John Wiley and Sons Inc. États-Unis. 634 pp.
- Croci, L., Serratore, P., Cozzi, A., Milandri, S., Suffredini, E. et Toti, L. **2001**. Detection of Vibrionaceae in mussels and in their seawater growing area. *Letter in Applied Microbiology*. **32**: 57-61.
- Doern, G.V. **1992**. Chapitre 177. The *Moraxella* and *Branhamella* Subgenera of the Genus *Moraxella*. In *The Prokaryotes*. Vol. IV Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H. (eds). Springer Verlag, New york. pp. 3276-3280.

- Dumontet, S., Krovacek, K., Svenson, S.B., Pasquale, V., Baloda, S.B. et Figliuolo, G. **2000**. Prevalence and diversity of *Aeromonas* and *Vibrio* spp. in coastal waters of Southern Italy. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* **23**: 53-72.
- Elson, R. et Leibovitz, L. **1980**. Detection of vibriosis in hatchery reared larval oysters: correlation between clinical, histological and ultrastructural observations in experimentally induced disease. *Proceedings of the National Shellfisheries Association.* **70**(1): 122-123.
- Elston, R. **1986**. Occurrence of branchial rickettsiales-like infections in two bivalve molluscs, *Tapes japonica* and *Patinopecten yessoensis*, with comments on their significance. *J. Fish Diseases.* **9** : 69-71.
- Euzéby, J.P. **2003**. Dict. de bactériologie. <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/garde.html>.
- Farmer III, J.J. **1992**. Chapitre 156. The family Vibrionaceae. *In The Prokaryotes.* Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H. (eds). Springer Verlag, New York. pp. 2938-2951.
- Farmer III, J.J. et Hickman-Brenner, F.W. **1992**. Chapitre 157. The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. *In The Prokaryotes.* Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H. (eds). Springer Verlag, New York. pp. 2952-3011.
- Farmer III, J.J., Arduino, M.J. et Hickman-Brenner, F.W. **1992**. Chapitre 158. The genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. *In The Prokaryotes.* Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H. (eds). Springer Verlag, New York. pp. 3012-3045.
- Farmer III, J.J. **1999**. The Family *Vibrionaceae*: The Genus *Listonella* and *Shewanella*. *In The Prokaryotes.* release. 3.0. Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H. (eds). Springer Verlag, New York. http://141.150.157.117:8080/prokPUB/showchunk/156/03_05.htm (2004-03-17)
- Gibson, D.M., Hendrie, M.S., Houston, N.C. et Hobbs, G. **1977**. The identification of some Gram negative heterotrophic aquatic bacteria. *In Aquatic microbiology.* Skinner, F.A. and Shewan, J.M. (ed). Academic Press Inc. London. pp. 135-155. (Applied Bacteriology)

- Gorbach, S.L., Mayhew, J.W., Barlett, J.G., Thadepalli, H., Onderdonk, A.B. **1976**. Rapid diagnosis of anaerobic infections by direct gas-liquid chromatography of clinical specimens. *Journal of Clinical Investigation*. **57**(2) :478-484.
- Götz, F., Bannerman, T. et Schleifer, K.-H. **2003**. The Genera *Staphylococcus* and *Macrococcus*. In *The Prokaryotes*. release. 3.16. Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H. (eds). Springer Verlag, New york. <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaphtm/356/COMPLETE.htm> (2004-03-29)
- Gulka, G., Chang, P.W. et Marti, K.A. **1983**. Prokaryotic infection associated with mass mortality of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *J. Fish Diseases*. **6** : 355-364.
- Hammes, W.P., Weiss, N. et Holzapfel, W. **1992**. Chapitre 70. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In *The Prokaryotes*. Vol. IV Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H. (eds). Springer Verlag, New york. pp. 1535-1545, 1558-1568.
- Hanson, C.W. et Martin, W.J. **1976**. Evaluation of enrichment, storage, and age of blood agar medium in relation to its relation to its ability to support growth of anaerobic bacteria. *J. Clinical Microbiology*. **4**(5): 394-399.
- Hardie, J.M. **1984**. Genus *Streptococcus*. In *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Vol. II. R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (eds). Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 1043-1071.
- Hariharan, H., Giles, J.S., Heaney, S.B., Arsenault, G., McNair, N. et Rainnie, D.J. **1995**. Bacteriological studies on mussels and oysters from six river systems in Prince Edward island, Canada. *J. Shellfish Research*. **14**(2): 527-535.
- Henis, Y., Gould, J. R. et Alexander, M. **1966**. Detection and identification of bacteria by gas chromatography. *Applied Microbiology*. **14**(4): 513-524.
- Higgins, Robert. **2003**. *Éléments de bactériologie vétérinaire*. Faculté de Médecine Vétérinaire (Université de Montréal). 213 p.
- Hofstad, T. **1999**. The Genus *Fusobacterium*. In *The Prokaryotes*. Release 3.0. Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H. (eds). Springer Verlag, New york.

http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaprender/jsp/showchap.jsp?chapnum=237&initsec=01_00. (2004-03-18)

- Holmes, B., Owen, R.J. et McMeekin, T.A. **1984**. Genus *Flavobacterium*. In Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Vol. I. R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (eds). Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 353-361.
- Holmes, B. **1992**. Chapter 198: The Genera *Flavobacterium*, *Sphingobacterium*, and *Weelsella*. In The Prokaryotes. Vol. IV Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H. (eds). Springer Verlag, New York. pp. 3620-3628.
- Huys, G., Coopman, R., Janssen, P. et Kersters, K. **1996**. High-resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. Int. J. Syst. Bact. **46**(2) : 572-58
- Janda, J.M. et Abbott, S.L. **1998**. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: An expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. Clin. Infection Diseases. **27**: 332-344.
- Jeanthon, C., Prieur, D. et Cochard, J.C.. **1988**. Bacteriological survey of antibiotic-treated sea waters in a *Pecten maximus* hatchery. Aquaculture. **71**: 1-8.
- Juni, E. **1984**. Genus *Acinetobacter*. In Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Vol. I. R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (eds). Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 303-307.
- Kandler, O. et Weiss, N. **1984**. Genus *Lactobacillus*. In Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Vol. II. R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (eds). Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 1209-1234.
- Kerr, A. **1992**. The genus *Agrobacterium*. .. In The Prokaryotes. Release 3.2. Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H. (eds). Springer Verlag, New York.
- http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaprender/jsp/showchap.jsp?chapnum=495&initsec=01_00 (2006-02-07)
- Kersters, K. et De Ley, J. **1984**. Genus *Agrobacterium*. In Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Vol. I. R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (eds). Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 244-254.

- Kita-Tsukamoto, K., Oyaizu, H., Nanba, K., Simidu, U. **1993**. Phylogenetic Relationships of Marine Bacteria, Mainly Members of the Family *Vibrionaceae*, Determined on the Basis of 16S rRNA Sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**: 8-19.
- Kloos, W.E. et Schleifer, K.H. **1984**. Genus *Staphylococcus*. In *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Vol. II. R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (eds). Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 1013-1035.
- Krovacek, K. **1996**. *Aeromonas* spp. as foodborne pathogens; studies on the occurrence and virulence profiles of *Aeromonas* spp. isolated from foods, drinking water, marine environment and human clinical sources. Swedish University of Agricultural sciences. Uppsala : Suisse. 272 pp.
- Lafont, René. **2005**. Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules : Chromatographie en phase gazeuse. Biologie et multimédia. Université Pierre et Marie Curie.
<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/chromato/A3.html> (2005-12-16)
- Lamoureux, Roxanne. **1985**. LE PÉTONCLE (*Placopten magellarinus*). LA PLONGÉE. **12(5)**
- Larpent, J.-P. **2000**. Introduction à la nouvelle classification bactérienne, les principaux groupes bactériens. Éditions Tec et Toc. Paris. 279 pp.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A. et Gobbetti, M. **2000**. Purification and Characterization of Novel Antifungal Compounds from the Sourdough *Lactobacillus plantarum* Strain 21B. *Applied Environmental Microbiology*. **66(9)** : 4084-4090.
- LeChevalier, M.W., Seider, R. et Evans, T.M. **1980**. Enumeration and characterisation of standard plate count bacteria in chlorinated and raw water supplies. *Appl. Environm. Microbilo.* **40** : 922-930.
- Leibovitz, L. **1989**. Chlamydiosis: a newly reported serious disease of larval and postmetamorphic bay scallops, *Argopecten irradians* (Lamarck). *Journal of Fish Diseases*. **12**: 125-136.

- Liltved, H., Hektoen, H. et Efraimsen, H. **1995**. Inactivation of bacterial and viral fish pathogens by ozonation or UV irradiation in water of different salinity. *Aquaculture Engineering*. **14**: 107-122.
- Lo, R.Y.C. et Shewen, P.E. **1992**. Chapitre 180. The Genus *Pasteurella*. In *The Prokaryotes*. Vol. IV Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H. (eds). Springer Verlag, New York. pp. 3331-3336.
- MacDonell, M.T., Singleton, F.L. et Hood, M.A. **1982**. Diluent composition for use of API 20E in characterizing marine and estuarine bacteria. *Applied and Environ. Microbiology*. **44**(2): 423-427.
- Mangels, J.I. et Douglas, B.P. **1989**. Comparaison of four commercial brucella agar media for growth of anaerobic organisms. *J. Clinical Microbiology*. **27**(10): 2268-2271.
- MAPAQ. **2005**. Fiche technique 2 : Le pétoncle géant *Placopecten magellanicus*. <http://www.mapaq.gouv.qc.ca/NR/rdonlyres/C323C22A-8AB4-42FF-B231-49A042125F74/0/petoncle.pdf> (2005-12-19)
- McGladdery, S.E., Drinnan, R.E. et Stephenson, M.F. **1993**. A manual of parasites, pests and diseases of Canadian Atlantic bivalves. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci., Department of Fisheries and Oceans, Gulf Fisheries Centre, Moncton, New-Brunswick. 121p.
- Mitruka, B.M. et Alexander, M. **1968**. Rapid and sensitive detection of bacteria by gas chromatography. *Applied Microbiology*. **16**(4): 636-640.
- Monroy, F., Hertel, L.A., Loker, E.S. **1992**. Carbohydrate-binding plasma proteins from the gastropod *Biomphalaria glabrata*: strain specificity and the effects of trematode infection. *Dev. Comp. Immunol.* **16**: 355-366.
- Moore, W.E.C., Holdeman, L.V. et Kelley, R.W. **1984**. Genus *Fusobacterium*. In *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Vol. I. R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (eds). Williams and Wilkins, Baltimore. pp 631-637.
- Morrison, C. et Shum, G. **1982**. Chlamydia-like organisms in the digestive diverticula of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lmk). *J. Fish Diseases*. **5**: 173-184.
- Morrison, C. et Shum, G. **1983**. Rickettsias in the kidney of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck). *J. Fish Diseases*. **6**: 537-541.

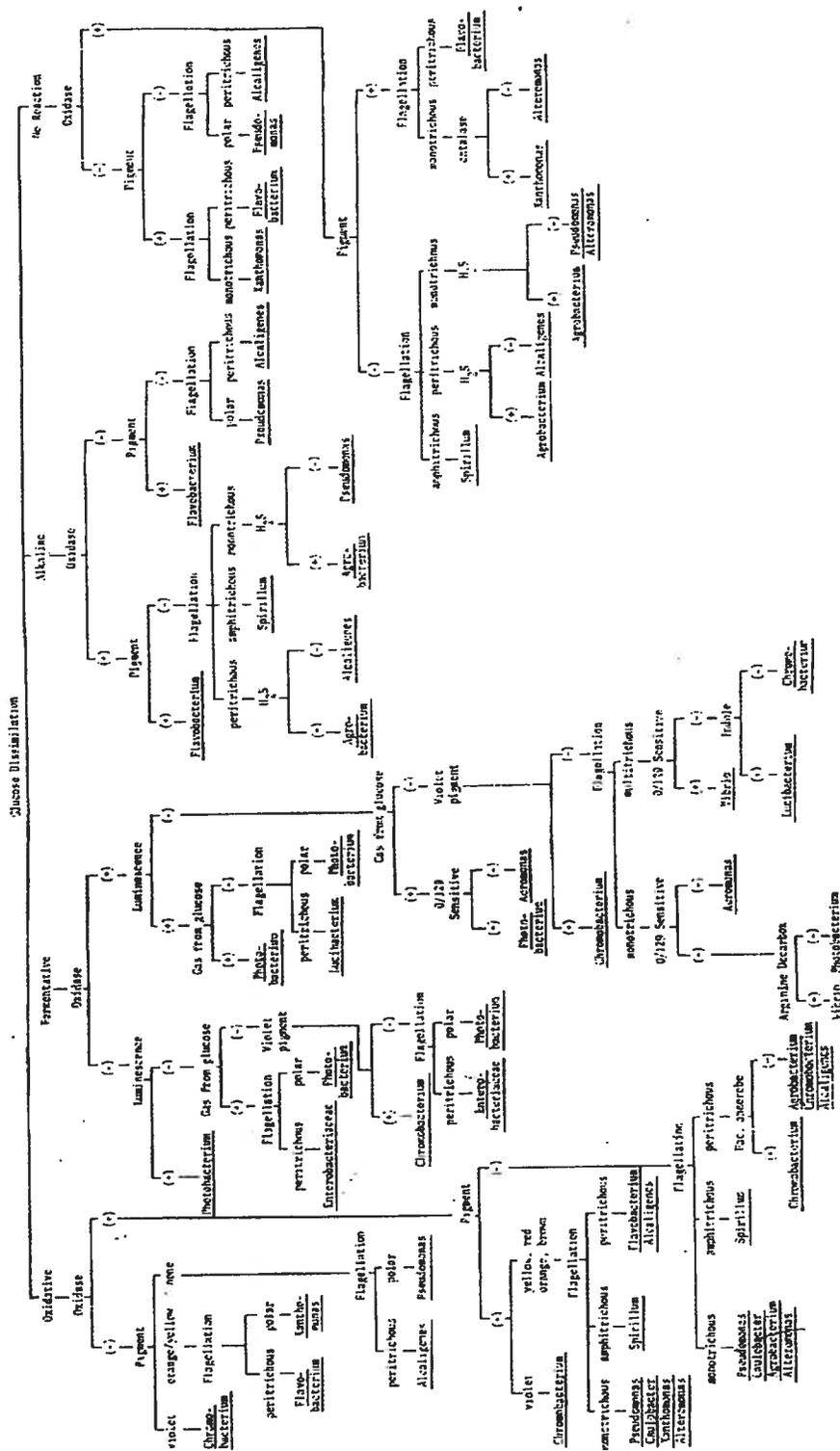
- Murray, P.R. **1978**. Growth of clinical isolates of anaerobic bacteria on agar media : effects of media composition, storage conditions, and reduction under anaerobic conditions. *J. Clinical Microbiology*. **8**(6): 708-714.
- Office québécois de la langue française. (1990). Le grand dictionnaire terminologique. Chromatographie en phase gazeuse. http://www.granddictionnaire.com/btml/fra/r_motclef/index800_1.asp (2005-12-16)
- Olafsen, J.A. **1995**. Role of lectines (C-reactive protein) in defense of marine bivalves against bacteria. *In Advances in mucosal immunology*. Mestecky, J. et al. (eds). New York : Plenum Press. p. 343-348.
- Oliver, J.D. **1982**. Taxonomic sheme for the identification of marine bacteria. *Deep-Sea Research.*, **29** (6a) : 795-798.
- Oho, T., Yoshida, Y., Himazaki, Y., Yamashita, Y., Koga, T. **2001**. Characteristics of patients complaining of halitosis and the usefulness of gas chromatography for diagnosing halitosis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics*. **91**(5) :531-534.
- Otta, S.K., Karunasagar, I. et Karunasagar, I. **2001**. Bacteriological study of shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius, hatcheries in India. *J. Appl. Ichthyol*. **17**: 59-63.
- Paillard, C., Le Roux, F., Borrego, JJ. **2004**. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquatic Living Resources*. **17**: 477-498.
- Palleroni, N.J. **1978**. The *Pseudomonas* group. Meadowfield Press Ltd. Durham : England. Patterns of Progress. 80 pp.
- Palleroni, N.J. **1992**. Introduction to the Family Pseudomonadaceae. *In The Prokaryotes*. Vol. IV. Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H. (eds). Springer Verlag, New york. pp. 3071-3085.
- Palleroni, N.J., 1999. Introduction to the Family *Pseudomonadaceae*. . *In The Prokaryotes*. release. 3.0. Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H. (eds). Springer Verlag, New york. http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaprender/jsp/showchap.jsp?chapnum=160&initsec=04_05 (2005-11-25)

- Pêches et Océans Canada. Santé et maladies des mollusques. **2001**. <http://www.glf.dfo-mpo.gc.ca/fm-gp/rf-pr/dise-mala-f.html>. publiée le 2001-02-08. Dernière modification le 2002-12-05. (2003-08-21).
- Popoff, M. **1984**. Genus *Aeromonas*. In Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Vol. I. R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (eds). Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 545-548.
- Prieur, G., Mevel, G., Nicolas, J.L., Plusquellec, A. et Vigneulle, M. **1990**. Interactions between bivalve mollusks and bacteria in the marine environment. *Oceanography and Marine Biology :An Annual Review*. **28**, 277-352.
- Renwranz, L. **1983**. Involvement of agglutinins (lectins) in invertebrate defense reactions: the immuno-biological importance of carbohydrate-specific lectin binding. *Dev. Comp. Immunol.* **7**:603-608.
- Ringø, E. et Strøm, E. **1994**. Microflora of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.) : gastrointestinal microflora of free-living fish and effect of diet and salinity on intestinal microflora. *Aquaculture and Fisheries Management*. **25**: 623-629.
- Ruiz-Ponte, C., Samain, J.F., Sánchez, J.L., Nicolas, J.L. **1999**. The benefit of a *Roseobacter* species on the survival of scallop larvae. *Marine Biotechnology* **1**: 52-59.
- Sakata, T. **1989**. Microflora of healthy animals. In : *Methods for the microbiological examination of fish and shellfish*. (ed. par: Austin, B. et Austin, D.A.). Ellis Horwood Limited: Chichester, England. 317 pp.
- Santé Canada. **2001**. Fiche technique santé-sécurité- matières infectieuses. Agence de santé publique du Canada, Bureau de la sécurité des laboratoires. <http://www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/msds101f.html> (2006-03-02)
- Sauvé, S., Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Sénécal, L., Goudreau, P., Fournier, M. **2002**. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (AG, CD, Hg and Zn). *Aquatic Toxicology*. **58**: 189-200.
- Skerman, V.B.D. **1976**. A guide to the Identification of the Genera of Bacteria. 2nd ed. Baltimore : The Williams and Wilkins Company.
- Swings, J. Lambert, B., Kersters, K. et Holmes, B. **1992**. Chapitre 134. The Genera *Phyllobacterium* and *Ochrobactrum*. In *The Prokaryotes*. Vol. III. Balows, A.,

- Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H. (eds). Springer Verlag, New York. pp. 2601-2604.
- Tanaka, T., Yan, L. et Burgess, J.G. **2003**. *Microbulbifer arenaceus* sp. Nov., a new endolithic bacterium isolated from the inside of red sandstone. *Current Microbiology*. **47**: 412-416.
- Todar, K. **2005**. *Staphylococcus*. In Todar's online textbook of bacteriology. University of Wisconsin-Madison department of bacteriology. <http://textbookofbacteriology.net/staph.html> (2006-02-08)
- Torkildsen, L., Samuelsen, O.B., Lunestad, B.T. et Bergh, Ø. **2000**. Minimum inhibitory concentration of chloramphenicol, florfenicol, trimethoprim/sulfadiazine and flumequine in seawater of bacteria associated with scallops (*Pecten maximus*) larvae. *Aquaculture*. **185**: 1-12.
- Towner, K. **2001**. The Genus *Acinetobacter*. . In *The Prokaryotes*. release. 3.7. Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H. (eds). Springer Verlag, New York. <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaprender/jsp/showchap.jsp?chapnum=434&initsec=0800>. (2004-03-17)
- Tubiash, H.S., Chanley, P.E. et Leifson, E. **1965**. Bacillary Necrosis, a Disease of Larval and Juvenile Bivalve Mollusks. 1. Etiology and Epizootiology. *Journal of Bacteriology*. **90**(4) : 1036-1044.
- Tubiash, H.S. Colwell, R.R. et Sakazaki, R. **1970**. Marine vibrios associated with bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *Journal of Bacteriology*. **103**(1) : 272-273.
- Waechter, M., Le Roux, F., Nicolas, J.-L., Marissal, É. et Berthe, F. **2002**. Caractérisation de bactéries pathogènes de naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas*. *C.R. Biologies* 325. 231-238.
- Whitman, K.A. **2004**. *Finfish and Shellfish Bacteriology Manual: Techniques and Procedures*. Iowa State Press. Ames: Iowa. pp.258 (Blackwell Publishing Company)

- Wikipédia. **2005.** *Streptococcus*. Wikipédia, l'encyclopédi libre.
<http://fr.wikipedia.org/wiki/Streptocoque> (dernière modification le 2006-01-23)
(2006-02-09)
- Wood, W.L., Higbee, D.J., Gooldy, M., Glogowski, S., Fitzpatrick, R., Karalus, R.J.,
Wood, T.D., Mangino, D.J. **2006.** Analysis of Volatile Bacterial Metabolites
by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. LCGC north america, solution
for separation scientists.
<http://www.lcgcmag.com/lcgc/article/articleDetail.jsp?id=302246> (2006-02-28)
- Yáñez, M.A., Catalán, V., Apráiz, D., Figueras, M.J. et Martínez-Murcia, A.J. **2003.**
Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene
sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology
53: 875-883.
- Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martínez-Romero, E., Kerr, A. et Sawada, H. **2001.** A
revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus,
and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium*
undicola de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R.*
rhizogenes, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. International Journal of Systematic
and Evolutionary Microbiology. **51**: 89-103.
- ZoBell, C.E. **1941.** Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of
heterotrophic aerobes. Journal of Marine Research. **4**: 42-75.
- Zobell, C.E. et Upham, H.C. **1944.** Bull. Scripps Inst. Oceanog. Univ. Cal. **5**: 239-292.

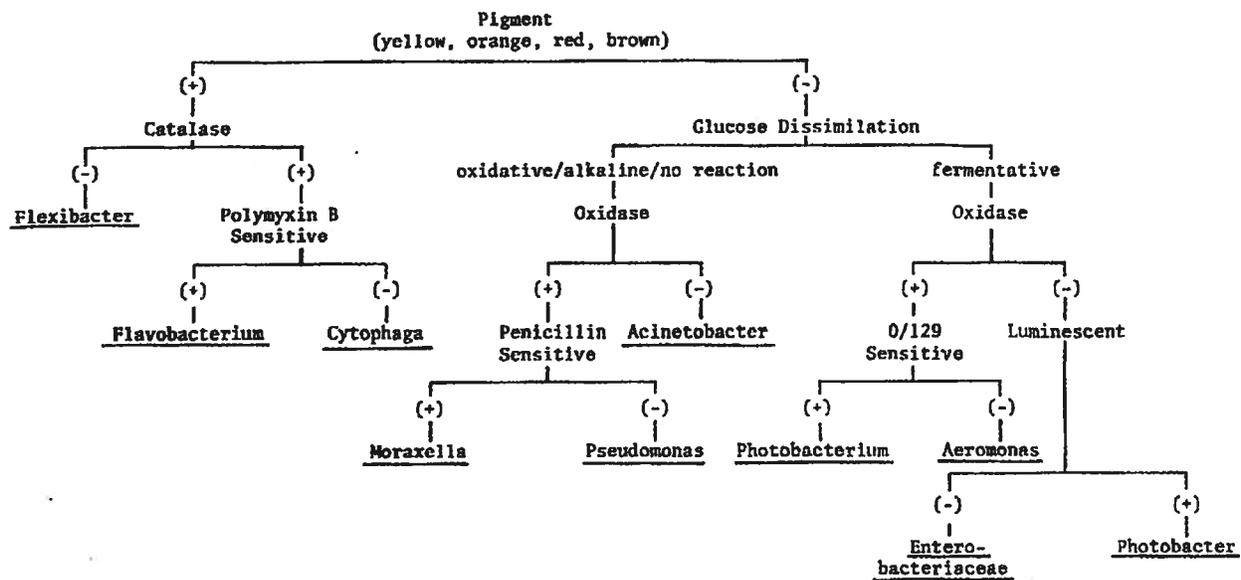
Annexe 1 : Clef taxonomique pour l'identification des bâtonnets à Gram négatif mobiles
(Oliver, 1982)



Taxonomic key for identification of mobile gram-negative rods.

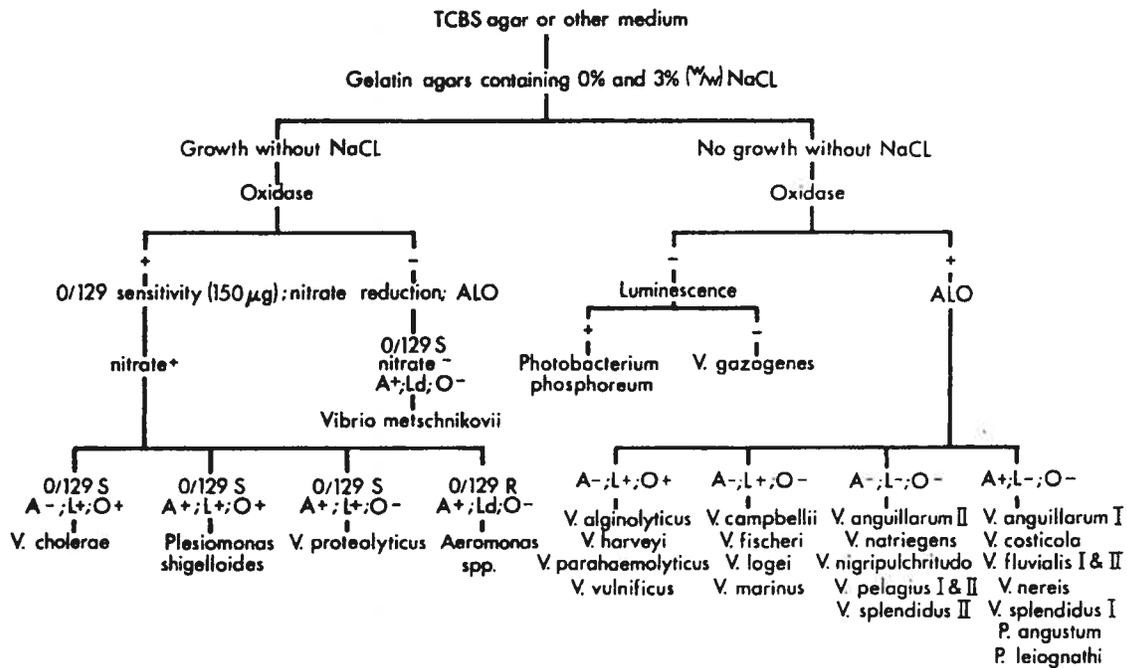
Annexe 2 : Clef taxonomique pour l'identification des bâtonnets à Gram négatif non-mobiles

(Oliver, 1982)



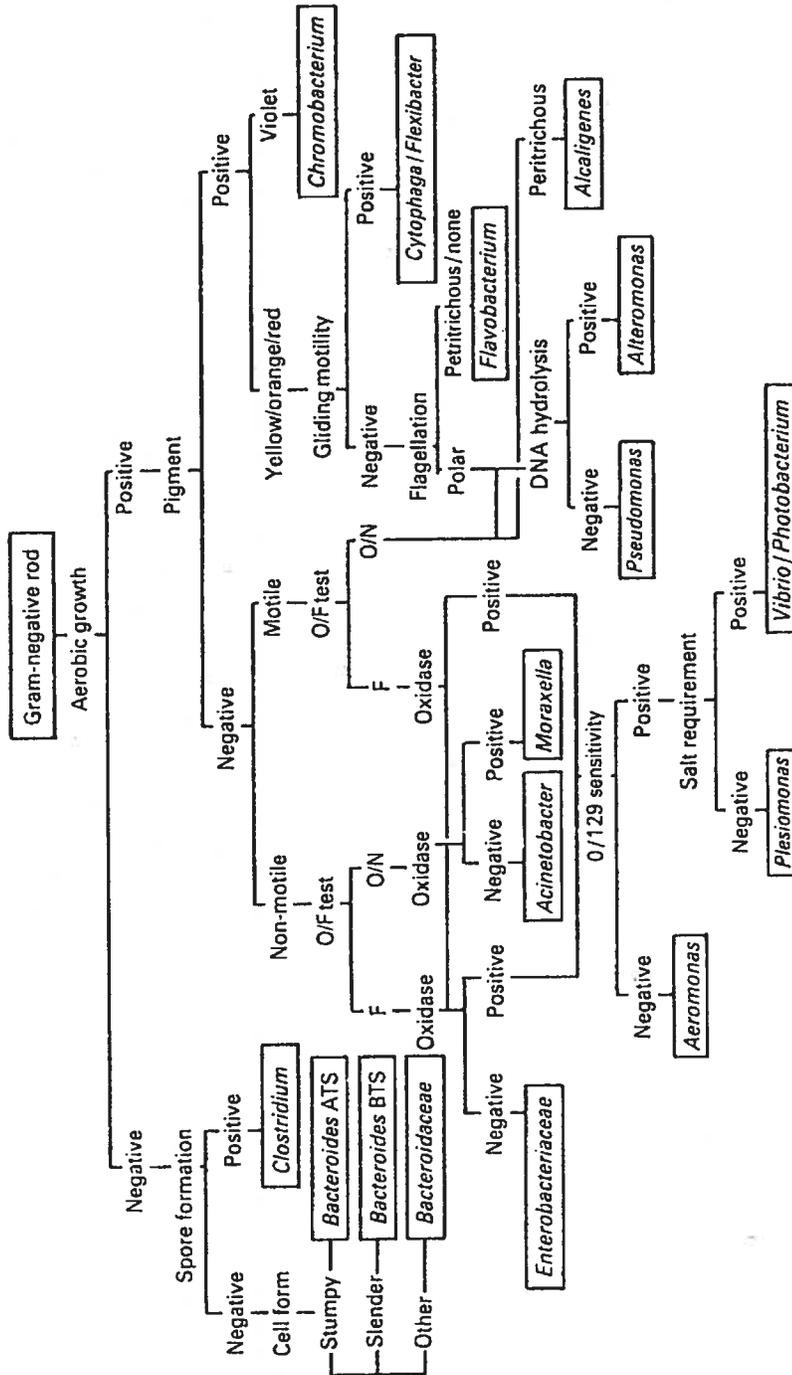
Annexe 3 : Clef d'identification préliminaire des *Vibrionaceae*

(Colwell, 1984)



Scheme for preliminary identification of species of the *Vibrionaceae* where ALO: arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase; 0/129: 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine phosphate (vibriostatic agent); S: sensitive, R: resistant, d: variable reaction among strains.

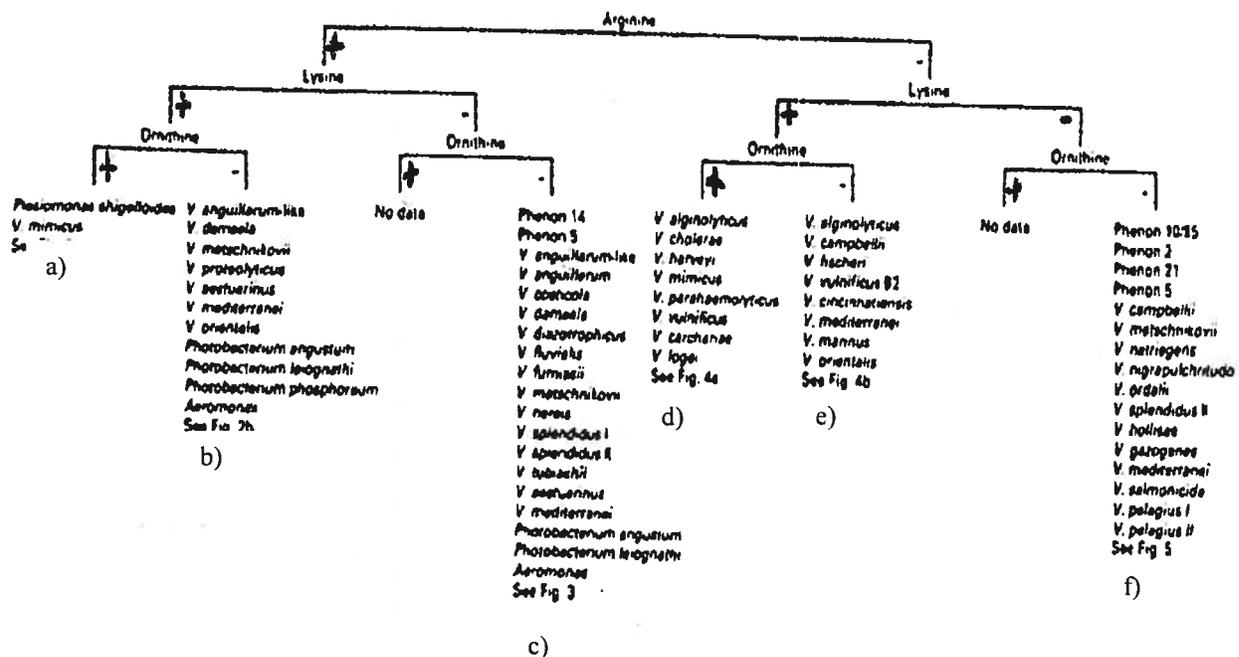
Annexe 4 : Clef d'identification rapide pour les bâtonnets à Gram négatif
(Sakata, 1989)



Rapid identification scheme for Gram-negative rods

Annexe 5 : Clef d'identification basée sur les résultats des tests d'arginine dihydrolase, ornithine et lysine décarboxylases

(Alsina et Blanch, 1994)



Annexe 6 : Clef d'identification basée sur les résultats des tests d'arginine dihydrolase, ornithine et lysine décarboxylases

(Alsina et Blanch, 1994)

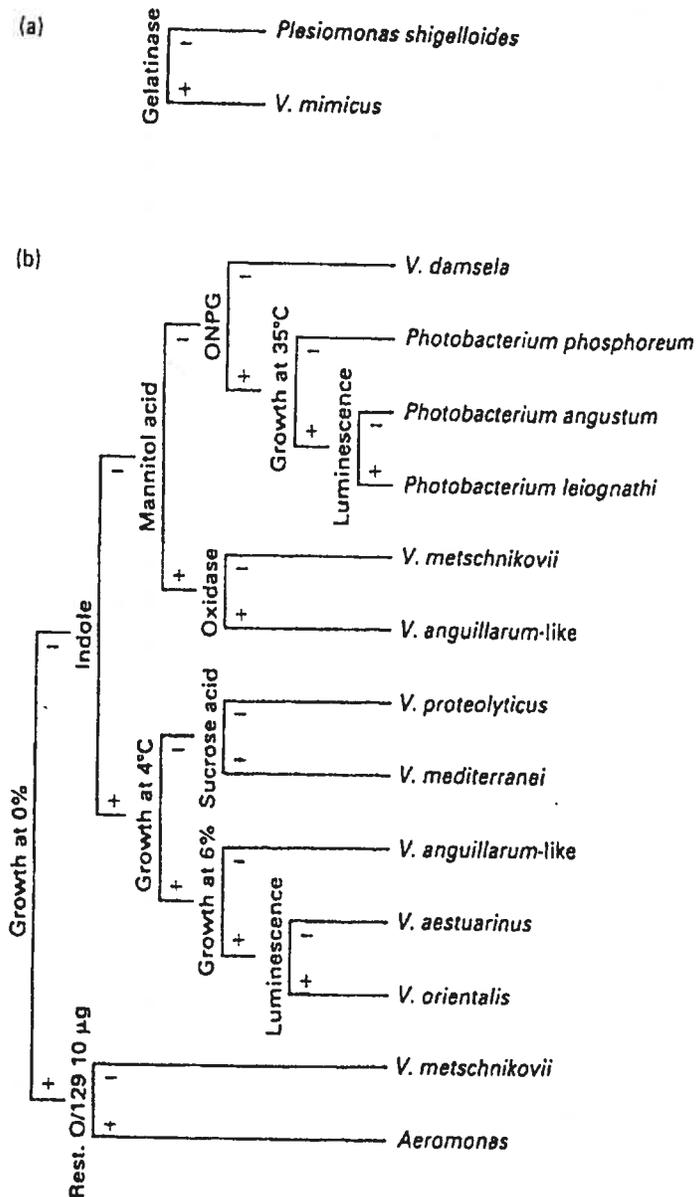


Fig. 2 (a) Identification key for cluster A +/L +/O +. (b) Identification key for cluster A +/L +/O -. Threshold exceptions: the mannitol acid and indole test have thresholds of $\geq 80\%$ (positive) and $\leq 20\%$ (negative) respectively for *Vibrio metschnikovii*

Annexe 7 : Clef d'identification basée sur les résultats des tests d'arginine dihydrolase, ornithine et lysine décarboxylases

(Alsina et Blanch, 1994)

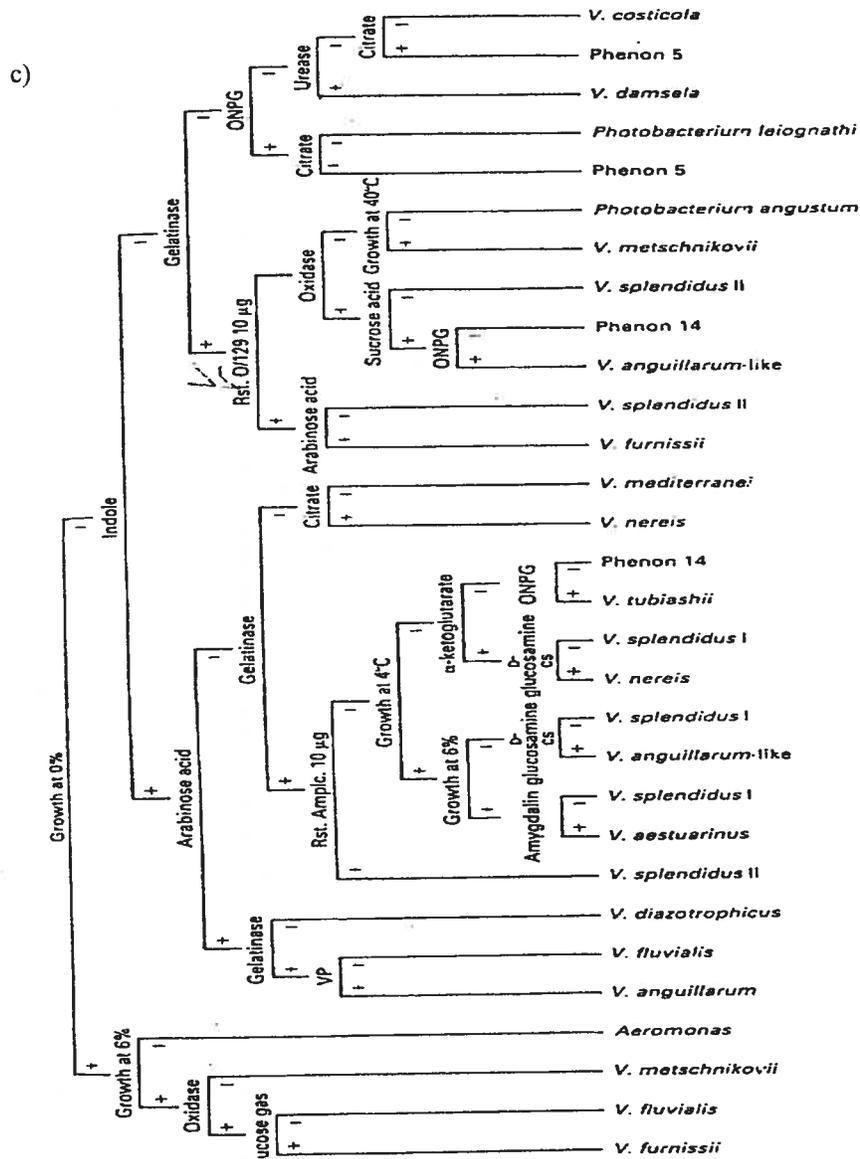


Fig. 3 Identification key for cluster A +/L- /O-. Threshold exceptions: the indole test has thresholds of $\geq 80\%$ (positive) for Phenon 14, *Vibrio anguillarum*, *V. fluvialis*, *V. nereis* and $\leq 20\%$ (negative) for *V. furnissii* and *V. metschnikovii*. The gelatinase test has thresholds of $\geq 80\%$ (positive) for *V. furnissii* and *Photobacterium angustum*. The arabinose acid test has threshold of $\geq 80\%$ (positive) for *V. anguillarum*. The resistance to O/129 10 µg test has threshold of $\leq 20\%$ (negative) for *P. angustum*. The growth at 4°C test has threshold of $\leq 20\%$ (negative) for *Vibrio nereis*. The growth at 0% NaCl test has threshold of $\leq 20\%$ (negative) for *V. anguillarum*. The growth at 6% NaCl test has threshold of $\geq 80\%$ (positive) for *V. metschnikovii*

Annexe 8 : Clef d'identification basée sur les résultats des tests d'arginine dihydrolase, ornithine et lysine décarboxylases

(Alsina et Blanch, 1994)

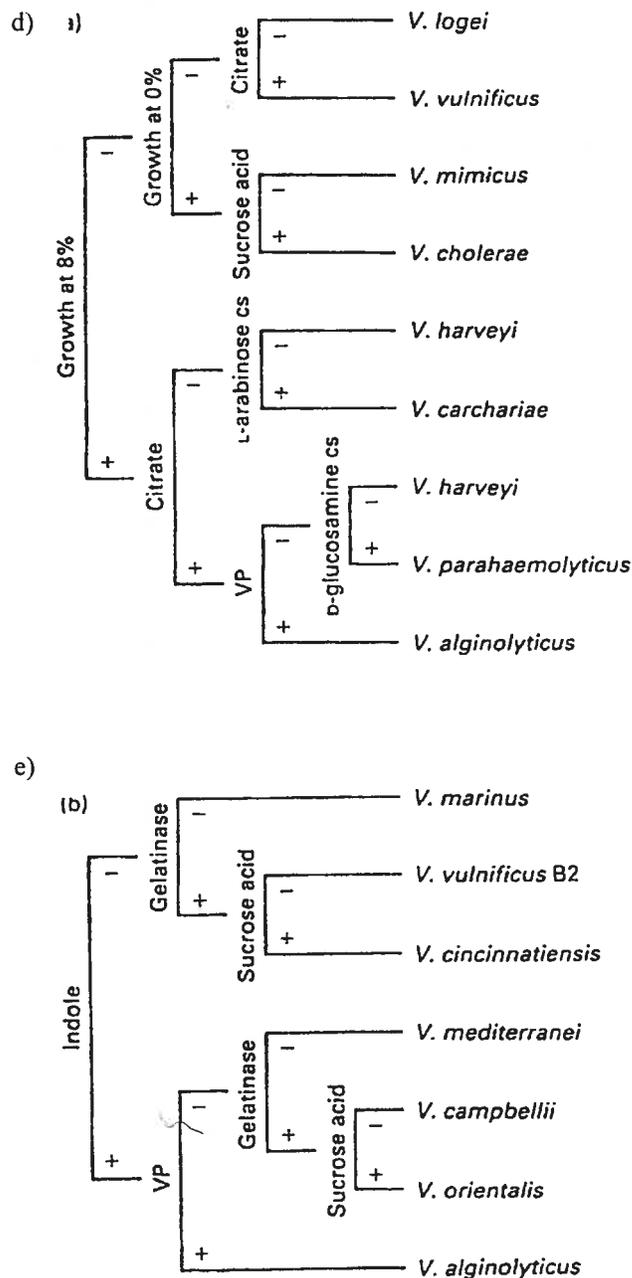
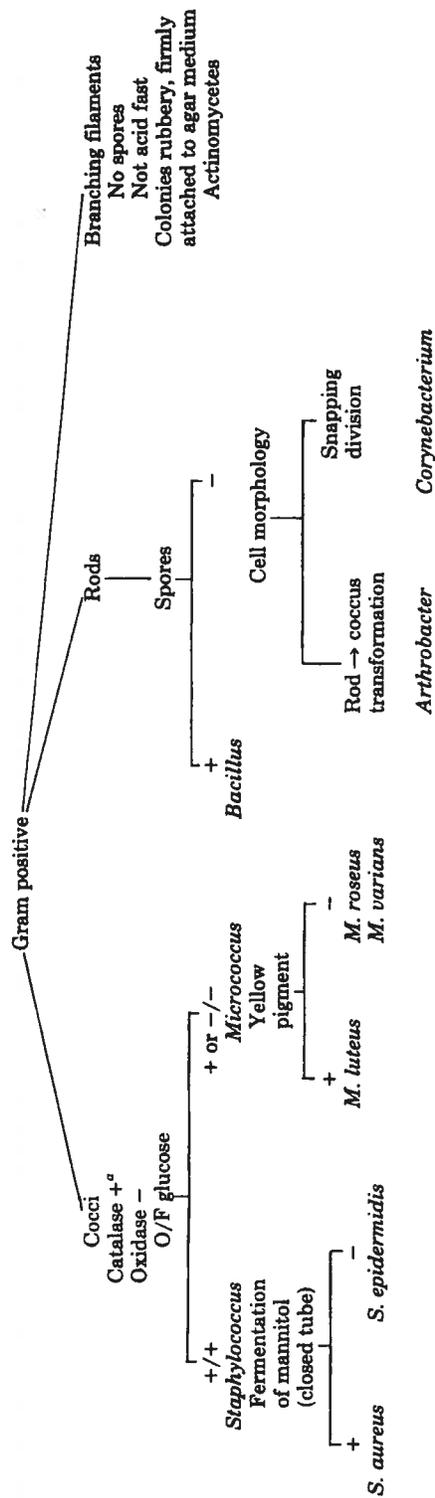


Fig. 4 (a) Identification key for cluster A -/L +/O +. (b) Identification key for cluster A -/L +/O -. Threshold exceptions: the growth at 8% NaCl test has threshold of $\geq 80\%$ (positive) for *Vibrio harveyi*. The indole test has threshold of $\geq 80\%$ (positive) for *V. campbellii*

Annexe 10 : Clef d'identification des bactéries à Gram positif provenant de l'eau
(LeChevalier, 1980)



Annexe 12 : Protocole de récupération et d'identification de la flore bactérienne du pétoncle géant *Placopecten magellanicus*

Isolation

- 1- Réception des spécimens et dissection aseptique en ne touchant pas à la coquille avec la lame stérile du scalpel.
- 2- Écouvillonnage des branchies et /ou glande digestive et ensemencement en 4 cadrans de deux (2) géloses Marine Agar (MA) pour chaque organe.
- 3- Placer une (1) gélose de chaque échantillon en anaérobie et l'autre en aérobie. Incuber à température pièce durant 2-3 jours en aérobie et une (1) semaine en anaérobie.
- 4- Pour chaque gélose, isoler sur une autre gélose MA chaque souche qui semble différente et en définir la quantité à l'aide du système 1+, 2+, 3+ et 4+. Incuber à t.p. durant 2-3 jours en aérobie et 7 jours en anaérobie.
- 5- Pour chaque isolat en anaérobiose, tester l'anaérobiose strict et faire une coloration de Gram pour congeler les inconnus qui semblent être différents dans du TBS avec 15% de glycérol.

Identification

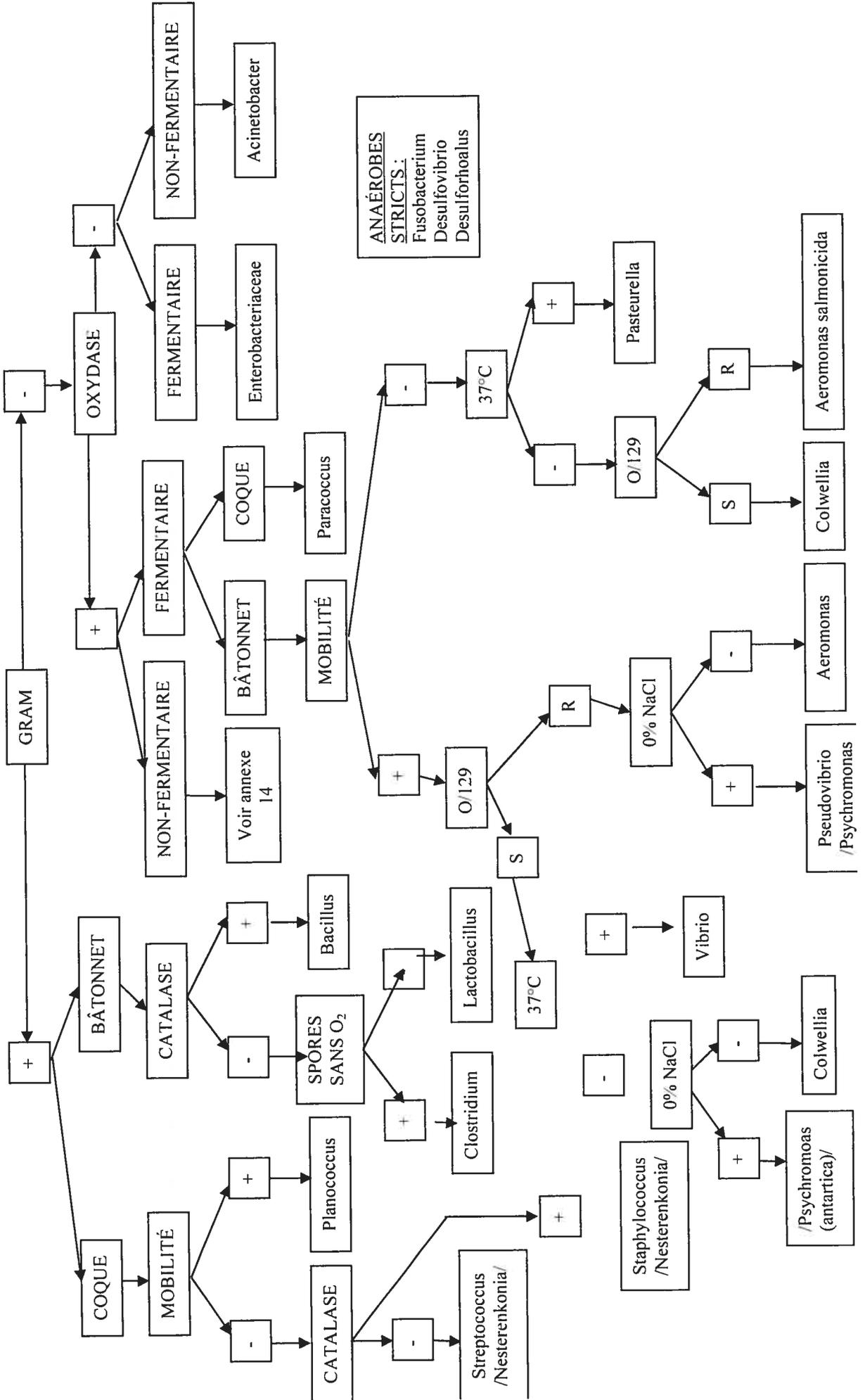
D'après ce que nous avons identifié, nous pouvons nous attendre à recueillir ces genres : *Colwellia*, *Flavobacterium*, *Actinobacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Shewanella*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Cytophaga*, *Fusobacterium*, *Roseobacter* et *Tenacibaculum* en plus de ceux déjà listés dans la littérature.

- 6- Pour chaque isolat, faire une coloration de Gram, les tests d'oxydase et de catalase, de mobilité par la goutte suspendue et du type de métabolisme (oxydatif/fermentaire) en ensemençant un tube TSI incubé a t.p. et vérifier à 48 heures et à 4-7 jours pour les bactéries à croissances lentes.
- 7- Se fier aux clefs en **annexes 13-14** pour le reste de l'identification au genre. (Les // signifie qu'il manque une information pour placer le genre dans le bon résultat au test)

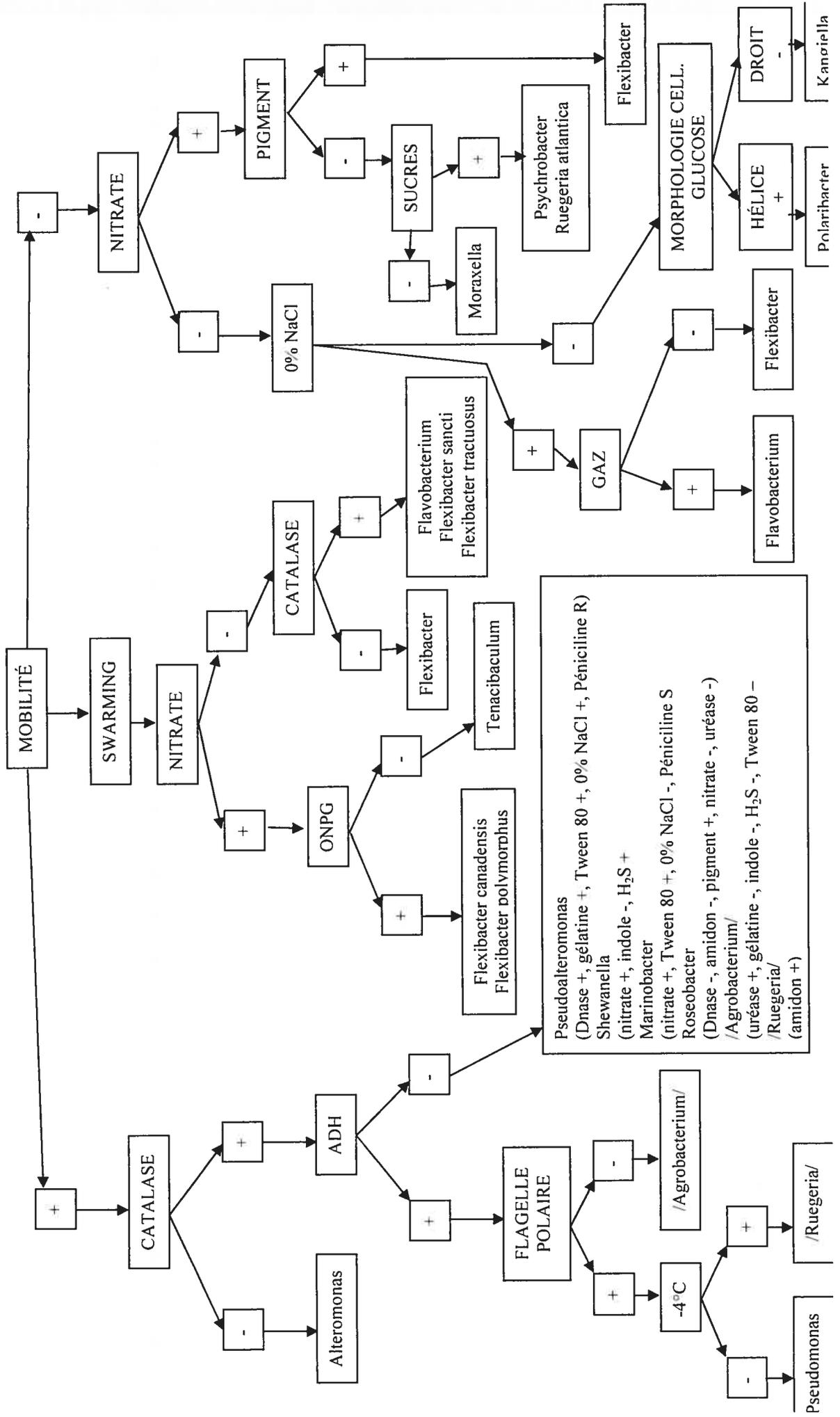
*Pour le test de résistance à l'agent vibriostatique O/129 (150 µg), on produit un tapis bactérien avec la souche à tester et on y appose le disque au centre et incube le tout à température pièce durant 24-48h.

*Le test d'exigence de Na^+ pour croître consiste à vérifier si la souche pousse après 48h d'incubation en absence de Na^+ sur milieu TSA (contient 0,5% de Na^+) et en présence de Na^+ sur milieu TSA supplémenté de NaCl jusqu'à concentration de 8%

Annexe 13 : Clef d'identification pour l'identification de la flore du pétoncle géant *Placopecten magellanicus*



Annexe 14 : Clef d'identification pour les bactéries aérobies ou anaérobies facultatives à Gram négatifs, non-fermentaires et oxydase positive du pétoncle géant *Placopecten magellanicus*



ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Stéphanie Cardin	
M.Sc.	Sciences vétérinaires
	Microbiologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Cardin, S. ; Messier, S. ; Fortin, M. ; Fournier, M. ; Fortier, M. et Uhland, F.C.	
Bacteriological study of the mass mortalities of the Sea scallop <i>Placopecten magellanicus</i> of the Lower North Shore, Quebec, Canada	
Aquaculture	En préparation

DÉCLARATION DES COAUTEURS

*A titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Stéphanie Cardin inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Étude bactériologique des mortalités massives et saisonnières du pétoncle géant *Placopecten magellanicus* de la Basse Côte-Nord du Québec.*

Serge Messier	2005.12.13
Carl F. Uhland	
Madeleine Fortin	2005.12.15
Michel Fournier	2005.12.15
Marlène Fortier	

¹Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001