



### **Titre de la thèse :**

Etude de la virulence et de la persistance de *Vibrio harveyi* en aquaculture par approche moléculaire et métatranscriptomique

### **Mots clés en français :**

Aquaculture, *Vibrio harveyi*, clade Harveyi, *Dicentrarchus labrax*, MALDI-TOF MS, Vibrionaceae, PCR en temps réel

**Laboratoire d'accueil ULCO :** UMRt INRAe n°1158 BioEcoAgro, Boulogne sur mer

**Equipe :** 8. Biochimie des Produits Aquatiques, Unité Sous Contrat Anses - ULCO

**Spécialité :** Biochimie, biologie moléculaire et microbiologie des produits aquatiques

**Site internet :** <https://icv.univ-littoral.fr/>

**Ecole doctorale :** Sciences, Technologie, Santé, UPJV

## **Sujet de thèse**

### ***Thématique***

Ce projet de thèse s'intègre dans la thématique de l'étude des flores pathogènes, particulièrement en structures aquacoles, développée au sein de l'Unité Biochimie des Produits Aquatiques de l'UMRt INRAe BioEcoAgro à Boulogne sur mer.

### ***Domaine***

Dans le cadre de cette thématique, l'intérêt est particulièrement porté sur les bactéries du genre *Vibrio* responsables d'épisodes de vibriose dans le milieu naturel mais aussi au sein de structures aquacoles (élevage de mollusques, crustacés, poissons). Les travaux de thèse de Julia MOUGIN (2017-2020) ainsi que le projet FEAMP LUVIBAR ont notamment permis la mise en place d'une collaboration avec Aquanord-Ictus (Gravelines, 59), spécialisé dans l'élevage de bars communs (*Dicentrarchus labrax*). Cette espèce est particulièrement touchée par la vibriose causée par *Vibrio harveyi* et entraîne des mortalités importantes.

Au cours de ses travaux de thèse, Julia MOUGIN a notamment réalisé une campagne d'échantillonnage, sur plusieurs mois, dans différents compartiments de la structure aquacole (arrivées d'eau alimentant les bassins, eau des bassins, parois des bassins). Cette campagne a permis d'identifier les populations bactériennes présentes et plus spécifiquement les espèces appartenant au genre *Vibrio*. Ainsi, plus d'un millier d'isolats de Vibrionaceae ont pu être échantillonnés et identifiés par spectrométrie de masse (Mougin *et al.*, (2020a)) et plus spécifiquement, plus de 200 isolats de *V. harveyi* ont été isolés à partir d'échantillons d'eau et de biofilms.

### ***Objectifs***

Ce projet de thèse permettra d'aller plus loin dans la compréhension du développement de la maladie en s'intéressant aux facteurs de virulence et à leur expression dans l'environnement aquacole. La « dangerosité » des souches bactériennes sera également étudiée à travers leurs capacités de persistance sous forme de biofilms mais aussi la présence et l'expression de gènes de résistance aux antibiotiques. L'objectif à terme, et à travers le concept « One Health », est de lutter efficacement contre la vibriose du bar *D. labrax* tout en développant un système aquacole respectueux de l'environnement et en réduisant l'usage d'antibiotiques afin de réduire les risques pour les poissons élevés mais aussi pour les consommateurs.

### ***Contexte***

Le présent projet de thèse s'inscrit essentiellement dans la continuité de la thèse de Julia MOUGIN (2017-2020) soutenue le 11 décembre 2020. Cette thèse s'inscrivait dans le cadre du projet européen FEAMP « LUVIBAR » (2017/2022), portant sur la lutte contre la vibriose du bar (*Dicentrarchus*

*labrax*). Ces travaux de thèse ont notamment permis l'élaboration de méthodes et d'outils d'identification et de quantification de *V. harveyi* (Mougin *et al.*, (2020b)) ainsi que d'identification des différentes espèces appartenant au clade Harveyi par spectrométrie de masse (Mougin *et al.*, (2020a)). Ces méthodes et outils permettront la réalisation des étapes 1 et 2 du présent projet. Le travail de thèse pourra également s'appuyer sur le séquenceur d'ADN à haut débit (Miseq Illumina) acquis dans le cadre du CPER MARCO en particulier pour le screening des gènes de virulence chez les différents isolats bactériens et pour l'étude métatranscriptomique portant sur l'expression différentielle des gènes « candidats » (gènes de virulence et d'antibiorésistance).

### **Méthode**

Etape 1 : échantillonnage représentatif de la diversité environnementale des bassins aquacoles

Etape 2 : Identification de souches potentiellement pathogènes

Etape 3 : persistance des souches et capacités à former des biofilms

Etape 4 : influence de paramètres environnementaux sur l'expression des facteurs de virulence

### **Résultats attendus**

Ce projet de thèse permettra d'aller plus loin dans la compréhension du développement de la maladie en s'intéressant aux facteurs de virulence et à leur expression dans l'environnement aquacole. La « dangerosité » des souches bactériennes sera également étudiée à travers leurs capacités de persistance sous forme de biofilms mais aussi la présence et l'expression de gènes de résistance aux antibiotiques. L'objectif à terme, et à travers le concept « One Health », est de lutter efficacement contre la vibriose du bar (*D. labrax*) tout en développant un système aquacole respectueux de l'environnement et en réduisant l'usage d'antibiotiques afin de réduire les risques pour les poissons élevés mais aussi pour les consommateurs.

### **Programme et échéancier de travail**

Etape 1 : échantillonnage représentatif de la diversité environnementale des bassins aquacoles

Les souches précédemment isolées de biofilms l'ont été sur des blocs de béton situés à une vingtaine de centimètres sous la surface de l'eau des bassins. L'objectif de cette première étape est donc d'obtenir une vision plus représentative des populations bactériennes présentes dans les bassins de la structure aquacole. Ainsi, une campagne d'échantillonnage y sera réalisée, sur plusieurs semaines, pour collecter les souches bactériennes établies en biofilms, sur toute la hauteur des bassins. Les paramètres physico-chimiques associés (luminosité, concentration en dioxygène, pH, température, ...) seront également mesurés pour chaque échantillon. Le travail de thèse portera uniquement sur les souches de *Vibrio harveyi* collectées mais une étude plus large des populations bactériennes totales présentes sera également entreprise au sein de l'unité de recherche. *V. harveyi* pourra être identifié et quantifié grâce à la technique de qPCR mise au point par Julia MOUGIN au cours de sa thèse (Mougin *et al.*, (2020a)) afin de mieux comprendre la dynamique spatiale de l'espèce bactérienne au sein des bassins aquacoles.

Etape 2 : Identification de souches potentiellement pathogènes

Cette étape se basera sur les isolats de *V. harveyi* collectés au cours de l'étape 1 mais aussi sur les isolats issus de la précédente campagne d'échantillonnage ainsi que sur les souches dites vaccinales, utilisées au cours des dernières années pour la mise au point de l'autovaccin. Par des techniques classiques de PCR mais aussi par séquençage haut débit, l'objectif de cette première étape sera de rechercher différents gènes de virulence identifiés à travers la littérature chez *V. harveyi* mais aussi chez différentes espèces de *Vibrio*. En effet, au sein de ce genre bactérien, les transferts de gènes horizontaux sont très fréquents. Une fois les gènes de virulence identifiés dans un premier temps chez les souches vaccinales, leur screening pourra être réalisé sur l'ensemble des souches de *V. harveyi* isolées lors des deux campagnes d'échantillonnage.

Parallèlement, sur l'ensemble des souches de *V. harveyi*, une recherche de gènes d'antibiorésistance sera menée en collaboration avec l'Anses. En s'appuyant sur la plateforme IdentityPath et sur les équipements de PCR à haut débit, il sera notamment possible de rechercher spécifiquement des gènes d'antibiorésistance ou encore des éléments géniques mobiles qui sont particulièrement identifiés chez les *Vibrio* comme vecteurs de facteurs de virulence.

Etape 3 : persistance des souches et capacités à former des biofilms

A l'issue des étapes 1 et 2, les souches les plus intéressantes en termes de gènes de virulence et/ou d'antibiorésistance seront étudiées quant à leurs capacités à former des biofilms. En effet, les travaux

précédemment menés ont permis de souligner la persistance des souches au sein des bassins aquacoles notamment sous forme de biofilms. Ainsi, les capacités d'adhésion et de production de biofilms des souches seront étudiées par microscopie confocale à balayage laser. Afin d'être au plus proche des conditions « dynamiques » rencontrées dans les bassins aquacoles, cette étude pourra être basée sur l'utilisation de chambres sous flux (« flow cells ») qui permettent la croissance du biofilm sous flux laminaire et l'observation directe par microscopie confocale à balayage laser.

Ces trois premières étapes vont donc permettre de sélectionner les souches de *V. harveyi* « intéressantes » de par leur potentielle virulence mais aussi de par leur capacité de persistance sous forme de biofilms dans les bassins.

Etape 4 : influence de paramètres environnementaux sur l'expression des facteurs de virulence

L'expression des gènes de virulence et d'antibiorésistance, identifiés lors de l'étape 2, sera ensuite étudiée, par une approche métatranscriptomique, chez les souches sélectionnées à l'issue des étapes 1 à 3. L'influence des environnements biotique et abiotique des souches bactériennes sur l'expression des gènes sera plus précisément étudiée. L'influence de l'environnement abiotique sera explorée en réalisant des cultures bactériennes sous différentes conditions de luminosité, de concentration en dioxygène, de pH ou encore de température. Pour chacun de ces paramètres, la gamme de valeurs testées sera définie en fonction des paramètres mesurés lors de la campagne d'échantillonnage (étape 1) afin d'être le plus représentatif possible de ce qui se passe dans les bassins aquacoles. L'influence de l'environnement biotique quant à elle, sera étudiée à partir de cultures mixtes. En se basant sur les résultats d'identification des populations bactériennes totales, obtenus grâce aux échantillons collectés lors de l'étape 1, l'expression des gènes de virulence, chez *V. harveyi* sera étudiée en présence de différentes autres espèces bactériennes appartenant au genre *Vibrio* ou à d'autres genres comme l'espèce *Photobacterium damselea* fréquemment isolées dans les bassins aquacoles.

## **Profil du candidat**

Le(la) candidat(e) devra être titulaire d'un Master en Biologie avec des solides connaissances en microbiologie et biologie moléculaire. Il(elle) devra avoir de l'expérience (stages de Master 1, 2, ou autres) en laboratoire de recherche et maîtriser les techniques de base de microbiologie (cultures bactériennes, dénombrement, isolement, ...) et de biologie moléculaire (en particulier PCR, qPCR). Des connaissances et un savoir-faire en séquençage haut-débit et/ou en microscopie confocale seraient également un plus. Enfin une maîtrise des outils de traitement de données, de biostatistiques et de bioinformatique serait particulièrement appréciée.

Par ailleurs le(la) candidat(e) devra faire preuve de rigueur et d'initiative, être disposé(e) à travailler en équipe et être prêt(e) à interagir avec les différents collaborateurs du projet. De bonnes capacités en anglais et plus généralement en communication scientifiques sont indispensables.

### **Modalités de candidature**

Les candidats doivent fournir un CV (en détaillant particulièrement les activités de recherche ainsi que les savoirs et savoir-faire en microbiologie et biologie moléculaire) ainsi qu'une lettre de motivation.

Les relevés de notes de Master 1 et Master 2 sont également à fournir pour l'étude des candidatures.

Les candidatures sont à envoyer par mail à l'adresse suivante : [cedric.le-bris@univ-littoral.fr](mailto:cedric.le-bris@univ-littoral.fr)

**Date limite de candidature : le 12/03/2021 à 12h00.**