

**Proposition de sujet de thèse pour une demande de contrat
doctorant**

1. FICHE SYNTHETIQUE

- **Titre du sujet de thèse proposé (français et anglais):** Mécanismes de virulence de *Vibrio parahaemolyticus*, bactérie potentiellement pathogène pour l'homme.

Virulence mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* a potentially pathogenic bacterium for humans.

- **Directeur de thèse :** Dominique HERVIO HEATH (LSEM/SG2M/RBE – Ifremer Brest)

- **Co-encadrement/Co-responsable scientifique :** Lionel DEGREMONT (LGPM/SG2M/RBE - Ifremer La Tremblade)

- **Laboratoire/unité, département d'accueil :** Laboratoire Santé, Environnement et Microbiologie/SG2M/RBE

- **Ecole doctorale de rattachement (préciser si l'équipe est équipée d'accueil d'une école doctorale, si oui le sujet sera-t-il éligible à l'appel d'offre de l'ED ?) :** ED des Sciences de la Mer et du Littoral / UBO, Brest

- **Cofinancement envisagé/obtenu (merci d'indiquer la date de l'appel d'offre si un projet a été déposé, les références du projet s'il est obtenu) :** Région Bretagne (appel à projet 2018)

- **Employeur envisagé :** (Est-ce que il s'agit d'un contrat de travail Ifremer, ou est-ce que l'étudiant sera employé à l'extérieur avec cofinancement Ifremer?) IFREMER

- **Résumé et mots-clés en français et en anglais (15 lignes max) :**

Les vibrions naturellement présents dans l'environnement marin et estuarien sont sensibles aux modifications du milieu et constituent un risque émergent en santé publique comme en santé animale. *Vibrio parahaemolyticus*, principale cause mondiale de gastroentérite associée à la consommation de fruits de mer crus ou insuffisamment cuits, est isolée régulièrement en France dans les coquillages (huîtres et moules) et les eaux littorales. Les hémolysines TDH et TRH, facteurs de virulence majeurs chez *V. parahaemolyticus*, ont été mises en évidence chez des souches environnementales isolées sur les côtes françaises. Cependant des études récentes indiquent que *V. parahaemolyticus* est pathogène même en l'absence de ces hémolysines, suggérant l'implication d'autres facteurs dans la virulence de cette bactérie.

Les objectifs de cette thèse seront 1) d'identifier les facteurs de virulence par une approche de génomique comparative et d'étudier l'expression de la virulence de souches présentant des profils différents par une approche *in vivo* – le but ultime étant d'identifier des facteurs qui permettent de distinguer les isolats « pathogènes pour l'Homme » et « non pathogènes » et 2) d'évaluer la capacité de *V. parahaemolyticus* à coloniser et à se multiplier chez différents lots et familles d'huîtres sauvages et sélectionnées pour leur résistance à des pathogènes de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Ces travaux apporteront des connaissances importantes quant à la sensibilité accrue ou non de familles d'huîtres sélectionnées à un pathogène humain. Ils permettront également de mieux connaître ces agents pathogènes et ainsi de mieux estimer le risque associé à leur présence dans l'environnement et tout particulièrement lors de la consommation de coquillages.

Mots clés : *Vibrio parahaemolyticus*, facteurs de virulence, expression *in vivo*, génomique comparative, colonisation, huître creuse, *Crassostrea gigas*.

Naturally occurring vibrios in the marine and estuarine environment are sensitive to environmental changes and thus, constitute an emerging risk in both public health and animal health. *Vibrio parahaemolyticus*, the main cause of gastroenteritis associated with the consumption of raw or undercooked seafood, is regularly isolated in France in shellfish (oysters and mussels) and coastal waters. Hemolysins TDH and TRH, major virulence factors in *V. parahaemolyticus*, have been found in environmental strains isolated from French coastal waters. However, recent studies indicate that *V. parahaemolyticus* is pathogenic even in the absence of these hemolysins, suggesting the involvement of other factors in the virulence of this bacterium.

The objectives of this thesis will be 1) to identify virulence factors by a comparative genomic approach and to study the expression of the virulence of strains with different profiles using an *in vivo* approach - the ultimate goal being to identify factors that would make possible to distinguish " human pathogenic" and "non-pathogenic" isolates and 2) to evaluate the ability of *V. parahaemolyticus* to colonize and multiply in different batches of wild oysters and families of *Crassostrea gigas* selected for their resistance to oyster pathogens. This work will provide important insights into the increased or decreased susceptibility of selected oyster families to a human pathogen. They will also help to better understand these pathogens and thus, to better estimate the risk associated with their presence in the environment and especially when consuming shellfish.

Keywords : *Vibrio parahaemolyticus*, virulence factors, *in vivo* expression, comparative genomics, colonization, Pacific oyster, *Crassostrea gigas*.

- Profil de candidature souhaitée en français et en anglais :

Master 2 en Microbiologie, biologie moléculaire et/ou génomique, pathologie. Bonne maîtrise de l'anglais.

Master Degree in Microbiology, molecular biology and/or genomic and pathology. Good working knowledge of English.

2. PROGRAMME DE RECHERCHE DETAILLE

2.1. Projet/Action Ifremer de rattachement :

Projet Horizon 2020 VIVALDI (PreVenting and mltigating farmed biVALve Diseases – 2016-2020). Demande complémentaire de financement sera faite lors de l'appel d'offres EC2Co en 2018 (Ecosphère continentale et côtière – action thématique : MICROBIEN, MICROBIologie Environnementale).

2.2. Exposé du projet :

Contexte scientifique ou technologique

Les changements globaux liés à l'augmentation de la température des océans mais aussi à des influences anthropiques plus directes, comme l'aquaculture, ont provoqué une augmentation et une apparition sans précédent des cas d'infections associées à *Vibrio* dans la population humaine de l'Europe du Nord et de la côte Atlantique des Etats Unis (Baker-Austin *et al.*, 2013 ; Vezzulli *et al.*, 2016) ainsi que des épisodes de mortalité massive chez les mollusques (Barbosa Solomieu *et al.*, 2015). Ces bactéries naturellement présentes dans les environnements marin et estuarien sensibles aux modifications du milieu, constituent un risque émergent en santé publique comme en santé animale.

Parmi les quatre vibrios non cholériques impliqués dans des infections humaines, *Vibrio parahaemolyticus* est reconnu comme la principale cause de gastroentérite associée à la consommation de fruits de mer crus ou insuffisamment cuits (Hervio-Heath, 2017). Cette bactérie

est isolée régulièrement en France dans les coquillages (huîtres et moules) et les eaux littorales (Cantet *et al.*, 2013). Les hémolysines TDH (Thermostable Direct Hemolysin) et TRH (TDH related Hemolysin), facteurs de virulence majeurs chez *V. parahaemolyticus* ont été mises en évidence chez des souches *V. parahaemolyticus* environnementales isolées sur les côtes françaises (Hervio-Heath *et al.* 2002 ; Estevès *et al.*, 2015). En 2012, Jones *et al.* montrent que *V. parahaemolyticus* est pathogène même en l'absence de ces hémolysines, suggérant l'implication d'autres facteurs dans la virulence de cette bactérie. La recherche par PCR de gènes codant pour ces hémolysines et pour des effecteurs du SSTT chez des souches *V. parahaemolyticus* cliniques et des souches isolées de coquillages et d'eau de mer prélevés sur les côtes françaises a permis d'identifier plusieurs profils géniques chez ces isolats, suggérant des profils de virulence différents (Lozach *et al.*, 2016). Les deux modèles animaux utilisés au laboratoire (souris adulte et chenille *Galleria melonella*, infection par injection) afin d'évaluer la virulence de *V. parahaemolyticus* ont ensuite permis de différencier des groupes de souches présentant des virulences distinctes (Coutard, 2007 ; Lozach *et al.*, 2016). Des études préliminaires utilisant le modèle d'infection animal développé par Ritchie *et al.* (2012 ; lapins) démontrent que des animaux infectés (*per os*, infection par ingestion) par une souche environnementale TDH+/TRH+ développent la maladie plus rapidement que ceux infectés par une souche clinique pandémique (TDH+) (Hervio-Heath *et al.*, 2016). Ces premiers résultats soulignent l'intérêt de ce modèle pour évaluer l'expression de la virulence des souches isolées de l'environnement

Face à ces premières observations, il apparaît comme une priorité de mieux connaître ces agents pathogènes de l'Homme et leurs facteurs de virulence. Dans ce contexte, et afin de mieux estimer le risque associé à la présence de ces vibrions dans l'environnement et tout particulièrement lors de la consommation de coquillages, il est également intéressant d'évaluer la « sensibilité » de lots d'huîtres sauvages et de familles d'huîtres sélectionnées pour leur survie à des pathogènes d'organismes marins (OsHV-1 et/ou *Vibrio aestuarianus*, Azéma *et al.*, 2017) à la colonisation et la multiplication potentielle d'un pathogène humain, *V. parahaemolyticus* chez ces animaux.

Les objectifs de cette thèse seront :

- d'identifier les facteurs de virulence par une approche de génomique comparative et d'étudier l'expression de la virulence de souches présentant des profils différents par une approche *in vivo* – le but ultime étant d'identifier des facteurs qui permettent de distinguer les isolats « pathogènes pour l'Homme » et « non pathogènes »
- d'évaluer la capacité de *V. parahaemolyticus*, pathogène de l'Homme, à coloniser et à se multiplier chez différents lots et familles d'huîtres sauvages et sélectionnées.

Positionnement du sujet dans la stratégie du département et de l'institut

Cette thèse traitera de santé humaine et permettra à terme de disposer de meilleurs marqueurs pour évaluer la virulence de souches *V. parahaemolyticus* environnementales. Elle apportera également des connaissances importantes quant à la sensibilité accrue ou non des familles d'animaux sélectionnés (résistantes à deux pathogènes d'huîtres) à un pathogène humain. Les résultats obtenus quels qu'ils soient seront d'intérêt pour la conchyliculture et ce travail de thèse s'inscrira dans un des enjeux majeurs de l'Ifremer et du département RBE qui est d'accompagner un développement durable de la pêche et de l'aquaculture dans un contexte de changement global.

Originalité et le caractère innovant des recherches

Les approches d'infections expérimentales proposées dans cette thèse feront appel à un nouveau modèle animal (lapin) et à un nouveau type d'infection – par ingestion - plus pertinents que ceux utilisés jusqu'à présent au laboratoire pour tester la virulence potentielle de bactéries pathogènes de l'Homme (souris, chenille *Galleria melonella* ; infection par injection - Coutard, 2007; Keomurdjian, 2015 ; Lozach *et al.*, 2016). Il prend en effet en compte l'infection par ingestion qui est le mode d'exposition de l'Homme à ces vibrions.

Une partie de cette thèse se fera en co-direction/encadrement scientifique (Lionel Degrémont) et en partenariat avec le LGPMM et bénéficiera ainsi des avancées importantes réalisées sur le modèle expérimental « huîtres » mis en place pour les pathogènes d'organismes marins

(Degrémont *et al.*, 2014 ; Travers *et al.*, 2017). De plus, ce projet s'inscrit dans la continuité des projets communs entre les différents laboratoires de l'unité SG2M (ANR Envicopas, MORBLEU).

Approches méthodologiques

1. Caractérisation des facteurs de virulence et étude de l'expression de la virulence chez un modèle animal.

a. Génomique comparative

Les souches *V. parahaemolyticus* isolées de coquillages et d'eaux marines et estuariennes prélevées sur les côtes françaises depuis 2000 présentent une grande diversité génétique (Esteves *et al.*, 2015). La recherche par qPCR des principaux facteurs de virulence décrits chez des souches cliniques – hémolysines et effecteurs du SSTT – chez des souches *V. parahaemolyticus* environnementales (n=43) et des souches cliniques (n=7) a permis d'identifier sept profils géniques de virulence (Lozach *et al.*, 2016). Le génome complet de 21 des 50 souches présentant des profils géniques de virulence différents identifiés par PCR (trois par profil génique) sera séquencé afin de confirmer la présence ou non de ces gènes et de déterminer les gènes spécifiques ou communs aux différents groupes de souches. Ces génomes seront comparés à ceux de souches pathogènes isolées dans des cas d'infections humaines (souche pandémique RIMD 2210633 et autres souches) : analyses *in silico*, annotation de génomes en partenariat avec J. Ritchie, Univ. Surrey et E. Jumas-Bilak (Univ. Montpellier)/A. Rincé (Univ. Caen)

b. Expression de la virulence par une approche *in vivo*.

La capacité des bactéries à coloniser et à se multiplier dans l'intestin est un pré-requis pour leur survie et le développement de l'infection chez l'Homme. Le développement récent d'un modèle basé sur une infection oro-gastrique – similaire au mode de contamination chez l'homme - montre que des lapins inoculés avec la souche *V. parahaemolyticus* clinique pandémique TDH+ (RIMD 2210633) développent des diarrhées sévères (Ritchie *et al.*, 2012). Des premiers essais d'infections avec deux souches *V. parahaemolyticus* environnementales TDH+ (IFVp195) et TDH+/TRH+ (IFVp201) montrent que la souche TDH+ n'induit pas de maladie chez les lapins alors que ceux infectés avec la souche *V. parahaemolyticus* TDH+/TRH+ développe la maladie – et plus rapidement que ceux inoculés avec la souche clinique pandémique TDH+ (RIMD 2210633). Des diarrhées sont présentes chez l'ensemble des lapins inoculés avec la souche environnementale TDH+/TRH+ et le nombre de bactéries retrouvées dans l'intestin est 10 à 100 fois plus élevé que celui retrouvé chez les lapins infectés par la souche environnementale TDH+.

Afin de valider ces observations, l'expression de la virulence sera testée à l'aide de ce modèle pour un certain nombre de souches *V. parahaemolyticus* dont le génome aura été séquencé. Sur la base de ces essais et de l'ensemble de ces données, il sera intéressant de déterminer si des marqueurs moléculaires de virulence autres que ceux décrits à ce jour permettront de distinguer les isolats « pathogènes » et « non pathogènes ». Ces essais *in vivo* seront réalisés à l'Université de Surrey, UK, en étroite collaboration avec le Dr J. Ritchie.

2. Colonisation et multiplication de *V. parahaemolyticus* dans des lots et familles d'huîtres *C. gigas*.

Nous évaluerons *in vivo* les capacités de colonisation et de multiplication de souches *V. parahaemolyticus* modèles marquées (GFP et résistance à un antibiotique ; Travers *et al.*, 2008) dans des lots d'huîtres *C. gigas* sauvages et des familles biparentales produites à La Tremblade dont certaines présentent une résistance accrue à OsHV-1 et *Vibrio aestuarianus*. Des comptages bactériens et des coupes histologiques seront réalisés dans différents compartiments (hémolymphe, tissus digestif) afin de comparer la sensibilité ou résistance des différents lots d'huîtres sélectionnés et de localiser les bactéries dans les tissus. Ces essais seront réalisés à La Tremblade dans la seconde partie de la thèse lorsque les installations expérimentales contrôlées seront disponibles.

Résultats attendus et leur valorisation

Les avancées suivantes pourront donner lieu à publication :

- Les données de génomique comparative et d'expression de la virulence *in vivo* conduiront à l'identification et à la sélection de marqueurs d'intérêt qui permettront de distinguer les souches *V. parahaemolyticus* pathogènes et non pathogènes.

- Détermination de la sensibilité ou de la résistance des lots d'huîtres sauvages et des familles sélectionnées à la colonisation par un pathogène humain, *V. parahaemolyticus*, responsable de gastroentérites associées à la consommation de produits de la mer crus ou insuffisamment cuits.

Collaborations avec des laboratoires extérieurs et plus particulièrement si opportun à l'international.

- Hydrosociences Montpellier – UMR 5569, Université de Montpellier – (Estelle Jumas-Bilak) / EA 4655 Unité de Recherche Risques Microbiens, Université de Caen (Alain Rincé) – **Génomique comparative et annotation de génomes.**
- Department of Microbial and Cellular Sciences, University of Surrey, Guilford, UK (Jennifer Ritchie) – **Génomique comparative et expression de la virulence *in vivo*.**

Références :

- Azéma P, Lamy JB, Boudry P, Renault T, Travers MA, Degrémont L. 2017. Genetic parameters of resistance to *Vibrio aestuarianus*, and OsHV-1 infections in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, at three different life stages. *Genet Sel Evol* 49:23.
- Baker-Austin C, Trinanés JA, Taylor NG, Hartnell R, Siitonen A, Martínez-Urtaza J. 2013. Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. *Nat Clim Change* 3:73–77.
- Barbosa Solomieu V., Renault T. and Travers MA. 2015. Mass mortality in bivalves and the intricate case of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invert. Pathology*. 131:2-10.
- Cantet F., Hervio-Heath D., Caro A, Le Mennec C., Monteil C., Quemere C., Jolivet-Gougeon A., Colwell R. R., Monfort P. (2013). Quantification of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* in French Mediterranean coastal lagoons. *Research In Microbiology*, 164(8), 867-874.
- Coutard, 2007. Quantification de l'expression de gènes de virulence chez *Vibrio parahaemolyticus* dans le milieu marin. Thèse Doctorat. 263pp.
- Degrémont L., Azéma P, Maurouard E, Brun A, Banabdelmouna A, Morga B, De Lorgeril J, Corporeau C, Pernet F, Travers MA. 2016. Mortalités d'huîtres creuses adultes (*Crassostrea gigas*) et infection à *Vibrio aestuarianus* – AESTU 3. *Ifremer. R.INT.RBE/SG2M-LGPMM*. 79p.
- Esteves K, Mosser T, Aujoulat F, Hervio-Heath D, Monfort P, Jumas-Bilak E. 2015. Highly diverse recombining populations of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* in French Mediterranean coastal lagoons. *Front Microb* 6(708):1-17.
- Hervio Heath D, Colwell RR, Derrien A, Robert-Pillot A, Fournier JM, Pommepuy M. 2002. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. *J Appl Microbiol* 92(6):1123-1135.
- Hervio-Heath D, Lozach S, Ritchie JM. Assessing the virulence of environmental TDH-producing *Vibrio parahaemolyticus* using different models of infection. *Vibrio2016*, Roscoff, 29 mars-1er avril 2016.
- Hervio-Heath D., Garry P. 2017. *Vibrio*, espèces pathogènes. *Microorganismes pathogènes et aliments*. ED. Lavoisier. STAA. 547-559.
- Jones JL, Ludeke CHM, Bowers JC, Garrett N, Fischer M, Parsons MB, et al. (2012). Biochemical, serological, and virulence characterization of clinical and oyster *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 50 2343–2352.
- Keomurdjian N. 2015. Caractérisation et expression de la virulence chez *Vibrio parahaemolyticus*. M2R.
- Lozach S., Richaird D, Keomurdjian N, Rincé A, Hervio-Heath D. 2016. Molecular characterization and virulence expression of environmental *Vibrio parahaemolyticus*. *Vibrio2016*, Roscoff, 29 mars-1er avril 2016
- Quilici ML, Robert-Pillot A. 2011. Infections à vibrions non cholériques. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Maladies Infectieuses, 8-026-F-15.
- Ritchie JM, Rui H, Zhou X, Iida T, Kodoma T, Ito S, Davis BM, Bronson RT, Waldor MK. (2012) 'Inflammation and disintegration of intestinal villi in an experimental model for *Vibrio parahaemolyticus*-induced diarrhea.'. *Public Library of Science PLoS Pathog*, United States: 8 (3).
- Travers MA, Barbou A., Le Goïc N, Paillard C, Koken M. 2008. Construction of a stable GFP-tagged *Vibrio harveyi* strain for bacterial dynamics analysis of abalone infection.
- Travers MA, Tourbiez D., Parizadeh L, Haffner P, Kozic-Djellouli A, Aboubaker M, Koken M, Degrémont L, Lupo C. 2017. Several strains, one disease : experimental investigation of *Vibrio aestuarianus* infection parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Vet Res* 48:32.
- Vezzulli L, Grande C, Reid PC, Hélaouët P, Edwards M, Höfle MG, Brettar I, Colwell RR, Pruzza C. 2016. Climate influence on *Vibrio* and associated human diseases during the past half-century in the coastal North Atlantic. *Proc Natl Acad Sci* 113(34).