



Mørkvedbukta research station

Rapport d'activité 2024

Call for Projects 2024 - SEA-EU-search@9

1/ Establishment of a collection of bacteria from sea-cucumber with a view to probiotic candidates in norwegian aquaculture

2/ Probiotic treatment to enhance growth and gut health in fish



KORSNES Kjetil
VERLHAC-TRICHET Viviane
CLERMONT Dominique
CHESNEAU Olivier
GAILLARD Fanny
LE CHEVALIER Patrick*

Nord University
Nord University
Institut Pasteur (CIP)
Institut Pasteur (CIP)
UBO-LBCM-EMR-CNRS-6076
UBO-LBCM-EMR-CNRS-6076



Table des matières

| | | |
|-------|--|----|
| I | Préambule –Contexte/état de l’art - objectifs | 3 |
| II | Matériel et méthodes | 5 |
| II.1 | Collecte des animaux..... | 5 |
| II.2 | Prélèvements des « extraits biologiques » | 5 |
| 1 | Mise en culture et dénombrement du microbiote cultivable..... | 5 |
| II.3 | Identification des isolats par séquençage du gène codant l’ARNr 16S..... | 6 |
| 1 | Préparation des amplicons | 6 |
| 2 | Contrôle de la taille des amplicons par électrophorèse | 6 |
| 3 | Séquençage du gène ARNr 16S, méthode de Sanger, Genomic Eurofins | 6 |
| 4 | Affiliation taxonomique par l’utilisation du logiciel en ligne BLAST de NCBI | 7 |
| II.4 | Complément d’identification par analyse Malдитof | 7 |
| III | Résultats et discussion | 8 |
| III.1 | Description de la collection bactérienne | 8 |
| III.2 | Identification des souches bactériennes isolées..... | 10 |
| IV | Conclusion | 14 |

Liste tables et figures

| | |
|---|----|
| Figure 1: pourcentage représentant l'origine des isolats bactériens (cf: fluide coelomique; s: épiderme) chez l’holothurie a pieds oranges, <i>Cucumaria frondosa</i> | 8 |
| Figure 2: Exemple de culture bactérienne sur milieu MA: 100uL d'un prélèvement de l'épiderme (1/10) . à gauche animal n°1, à droite animal n°4 | 9 |
| Figure 3: exemple de culture de souches pures bactériennes sur milieu gélosé | 9 |
| Figure 4: exemple d'électrophorèse de contrôle de la taille des amplicons | 10 |
| Figure 5: distribution des souches au niveau du rang taxonomique de l'ordre..... | 10 |
| Figure 6: Pourcentage des souches affiliées à un genre bactérien..... | 11 |
| Figure 7: Affiliation taxonomique au rang de l'espèce (référence avec des souches types) A gauche souche de référence type, à droite nombre de représentants dans la collection. Le rectangle en rose précise l’incertitude de l’affiliation au rang de l’espèce..... | 12 |
| Figure 8: dendrogramme fourni par l'analyse des protéines ribosomales des souches de la collection bactérienne | 13 |
| Figure 9: identification des bactéries par espèce : la zone rouge correspond à un pourcentage d’identité d’environ 95% | 14 |
| Tableau 1: souches bactériennes de la collection présentant des % d'identité inférieur à 98% | 12 |

I Préambule –Contexte/état de l’art - objectifs

Préambule

En poste à l’IUT de Quimper, j’ai appris lors des « International days » en avril 2022 que l’Université de Bodø « Nord University » venait d’intégrer le dispositif « SEA-EU ». Or il s’avère que j’ai un contact dans cette université norvégienne, Dr Kjetil Korsnes Associate professor II at Nord University, qui travaille sur l’aquaculture des saumons. Dans le passé, nous avons travaillé sur une problématique de pathologie de vénéréculture en Norvège (Paillard et al., 2008). Par ailleurs en décembre 2019, j’ai eu l’opportunité d’être « first oponent » pour la thèse de Jonathan HIRA à l’université de Tromsø , The Arctic University of Norway (annexe 1). Les contacts, la thématique de la division recherche en aquaculture nous confortaient dans la proposition d’un projet dédié à l’usage des probiotiques en aquaculture.

Contexte-état de l’art

L’excès de l’utilisation d’antibiotiques en élevage aquacole a conduit à une interdiction de ces composés en salmoniculture, en pisciculture d’une manière générale (“The success recipe for eradicating antibiotics in Norwegian salmon farming,” 2022). L’usage de probiotiques peut constituer une stratégie alternative à la lutte contre certaines pathologies en renforçant l’immunité chez les poissons. La FAO en 2001 définit un usage circonscrit des probiotiques (Joint FAO WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, 2006)

De l’holobionte au microbiote, la présence de bactéries associées à un compartiment biologique donné pose la question du rôle de celles-ci. Plusieurs études démontrent les liens entre le microbiote, les grandes fonctions physiologiques et l’état de santé de l’hôte, notamment le lien entre microbiote gastro-intestinal et digestibilité (Limborg et al., 2018; Reilly et al., 2008), entre dysbiose du microbiote intestinal et obésité (Turnbaugh and Gordon, 2009), ou encore entre microbiote cutané et défense (Chiarello et al., 2018; Rebollar et al., 2018).

De ces microbiotes, seule une faible part est cultivable, et dépendante du compartiment biologique d’origine (Enomoto et al., 2012). La culture de ces bactéries cultivables permet de rechercher des activités biologiques d’intérêt, comme des souches présentant des activités antibactériennes, ou d’autres activités enzymatiques. Ces souches d’intérêt biotechnologique peuvent devenir des candidats probiotiques à condition de remplir de très nombreux critères parmi lesquels leur facilité de culture et leur **innocuité** sur l’hôte considéré (Hill et al., 2014; Sanders, 2008). Ces probiotiques ont plusieurs applications possibles, depuis la santé humaine (Gill and Guarner, 2004; Kerry et al., 2018), la lutte biologique et la biostimulation en agriculture (Woo and Pepe, 2018; de Souza Vandenberghe et al., 2017), l’amélioration des performances zootechniques en agriculture (Adewole and Akinyemi, 2021; Al-Shawi et al., 2020) et aquaculture (Limborg et al., 2018; Hai, 2015; Vine et al., 2006; Verschuere et al., 2000). En aquaculture, certaines souches probiotiques, telles que le genre *Bacillus*, permettent

de booster les **performances de croissance** (Adorian et al., 2019; Zhao et al., 2016; Chi et al., 2014), et/ou bien limiter la mortalité, et/ou protéger des agents pathogènes (Offret et al., 2019b; Tarnecki et al., 2019; Kapareiko et al., 2012), et/ou d'améliorer les qualités organoleptiques des produits de l'aquaculture (Huerta-Rábago et al., 2019; Nguyen et al., 2018).

Objectifs

Outre des activités pédagogiques, K. Korsnes est également chercheur au sein d'une entreprise de biotechnologie aquacole, Bio Vivo Technology AS Aqua Predict, et développe une stratégie de Prévention, déclinée par « Probiotiks Use » et par « Machine learning » soit la mesure d'analytes sanguins pour définir l'état de stress des poissons en élevage.

Le projet ciblait donc l'exploration de l'utilisation de 3 souches bactériennes du LBCM en tant que potentiels probiotiques et la recherche de bactéries à partir du concombre de mer à pieds oranges, *Cucumaria frondosa*. Cette souchothèque ainsi constituée sera criblée pour des activités biologiques telles que des activités antibactérienne, protéolytique voire agarolytique. L'étude du microbiote cultivable de cet hôte pour la recherche de souches bactériennes d'intérêt est une première étape vers le développement d'une aquaculture durable et saine.

II Matériel et méthodes

II.1 Collecte des animaux

La collecte des concombres de mer à pieds oranges a été entreprise par un plongeur local en plongée subaquatique à Godøystraumen à une profondeur de 12 m avec une température de l'eau de mer 5°C). Le point orange sur la carte ci-dessous précise le lieu du prélèvement (points GPS : 67°14'35,43" N, 14°42'35,2 W).



II.2 Prélèvements des « extraits biologiques »

Écouvillonnage de l'épiderme

Le microbiote cutané de l'animal est récupéré par l'écouvillonnage d'une surface du dos de l'animal. L'écouvillon est par la suite placé dans 5 mL d'eau de mer artificielle stérile, l'échantillon est conservé dans de la glace avant d'être utilisé.

Collecte du liquide cœlomique

Le liquide cœlomique est prélevé à l'aide d'une aiguille stérile (25G) fixée sur une seringue de 2,5 mL. Au préalable, la zone de biopsie est désinfectée avec de l'alcool à 70° et l'aiguille est flambée au bec bunsen. La biopsie se fait par insertion de l'aiguille dans la cavité cœlomique au 2/3 de l'animal depuis le pôle oral, sur la face dorsale (annexe 2). Au minimum 1,5 ml de liquide cœlomique sont prélevés et aussitôt disposés dans de la glace.

1 Mise en culture et dénombrement du microbiote cultivable

Des dilutions en cascade sont opérées dans de l'eau de mer artificielle stérile pour les échantillons de microbiote cutané (1, 10^{ème}), et cœlomique (1, 10^{ème}, 100^{ème}). Ensuite, 100 µl des solutions diluées et non diluées sont étalés sur milieu solide Marine Agar, MA, (Difco 2216)

puis les boîtes de Pétri placées en incubation à 12°C. Un dénombrement de colonies est effectuée après 3 jours d'incubation.

II.3 Identification des isolats par séquençage du gène codant l'ARNr 16S

La séquence de l'ADN16S est utilisée en taxonomie bactérienne (Weisburg et al., 1991). Le terme isolat bactérien sera délaissé au profit de souche bactérienne à l'issue de l'identification des bactéries isolées.

1 Préparation des amplicons

Après 48 h de culture en milieu MB à 12°C, et sous agitation, 1,5mL de culture ont été placés dans différents tubes, et sont centrifugés (10000 g, 10 min), afin de ne conserver que les culots cellulaires. L'extraction d'ADN a été réalisée grâce au kit « NucleoSpin Microbial DNA » (MACHEREY-NAGEL). L'ADN génomique bactérien est élué dans 100µL d'Elution Buffer BE (Tris-HCl 5nM, pH 8,5) et est stocké à -20°C.

Le principe de la PCR est basé sur l'amplification *in vitro* de séquences spécifiques d'ADN (Mullis and Faloona, 1987). Le gène 16S de l'ADNr est amplifié avec les amorces universelles modifiées forward 27F-w18 (5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), reverse 1492R-w20 (5'-GNTACCTTGTTACGACTT-3') et le OneTaq master mix (New England BioLabs, Ipswich, USA), selon le programme PCR suivant : dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, 30 cycles à 95°C pendant 30s, 54°C pendant 1 min, 68°C pendant 1 min, et une élongation finale à 68°C pendant 5 min. Un blanc contenant tous les éléments du mélange réactionnel sans ADN a été utilisé comme contrôle négatif. Le fragment amplifié a une taille approximative de 1500 paires de bases.

2 Contrôle de la taille des amplicons par électrophorèse

Les produits PCR ont été visualisés après électrophorèse (70V/cm, 30 min) sur un gel d'agarose à 1% dans un tampon TAE 1X. Sur chaque gel un marqueur de taille moléculaire 1kb a été utilisé (DNA Ladder-Proméga). Les bandes d'ADN ont été visualisées sous transillumination UV en présence de Sybergold.

3 Séquençage du gène ARNr 16S, méthode de Sanger, Genomic Eurofins

Les échantillons sont ensuite envoyés pour séquençage du 16S à la plateforme de séquençage Sanger chez Genomics Eurofins (Ebersberg - Allemagne.)

Les différentes souches ont été séquencées en utilisant les mêmes amorces.

4 Affiliation taxonomique par l'utilisation du logiciel en ligne BLAST de NCBI

Les séquences forward et reverse sont assemblées, après transformation la séquence reverse en ligne (outil « Reverse Complement », disponible sur : https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html), puis alignées et affiliées grâce aux bases de données 16S avec BLASTn (Altschul et al., 1990) sur le serveur NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Une identification au genre sera déterminée.

II.4 Complément d'identification par analyse Malditof

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est une technique qui permet d'identifier rapidement et précisément le genre et l'espèce d'une bactérie à partir d'une colonie isolée sur gélose. L'identification se fait à partir de protéines ribosomales. Au LBCM, l'analyse MALDI-TOF se fait avec le spectromètre MALDI Biotyper[®] Sirius de la marque Brüker. Le principe de la technique consiste en une ionisation, une séparation et une détection des analytes, le tout sous-vide à 10^{-7} bar. L'identification de bactéries par MALDI-TOF se fait avec des colonies récentes et isolées. Le Standard de Test Bactérien (BTS), sert de calibrant pour l'analyse. Il contient de la myoglobine, de la RNase A et un extrait d'*Escherichia coli DH5α* présentant un profil protéique spécifique ainsi que de deux protéines de poids moléculaire plus élevé. La gamme de masse ainsi couverte va de 3,6 à 17 kDa ("Instruction for use Brucker Bacterial Test Standard," 2012). Pour chaque bactérie à identifier un spectre est donc obtenu. Le spectre est comparé avec ceux de la base de données du MALDI dans le but de trouver le spectre protéique le plus semblable. Le spectre protéique de la base de données étant associé à une bactérie formellement identifiée, il est ainsi possible d'identifier facilement la bactérie testée avec un score d'identification associé.

Les résultats issus de l'analyse par le logiciel Biotyper[®] sont exprimés avec un score en log score allant de 0 à 3 qui correspond à une similitude avec un spectre de la base de données. Le calcul de ce score tient compte de la concordance des pics de même rapport m/z et la corrélation d'intensité entre les pics similaires. Un score supérieur ou égal à 2 correspond à une bonne identification au niveau du genre et de l'espèce, un score inférieur est incertain : entre 1,99 et 1,70 le niveau de confiance du résultat est bas : le genre peut être bon mais pas forcément l'espèce et en dessous de 1,70 aucune identification fiable du micro-organisme n'est possible (Gravet and Gessier, 2013)

III Résultats et discussion

III.1 Description de la collection bactérienne

La décision de choisir une température de 12°C en première instance repose sur l'accès à une étude au laboratoire de Bodø. En France, au LBCM, les bactéries ont été remises en culture à 18°C (cela peut expliquer la perte de certains isolats).

La collection est composée de 48 isolats bactériens issus de 5 holothuries. Après les prélèvements, les animaux sont relâchés dans le milieu naturel (annexe 1).

Une forte majorité (77%) des isolats bactériens provient de l'écouvillonnage de l'épiderme (fig.1).

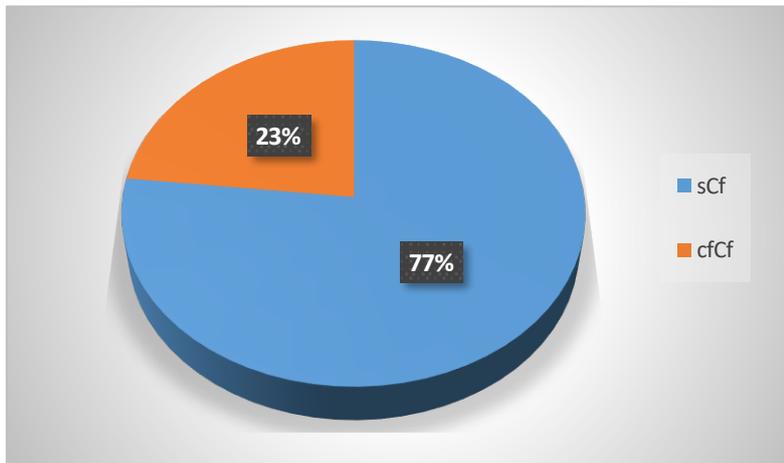
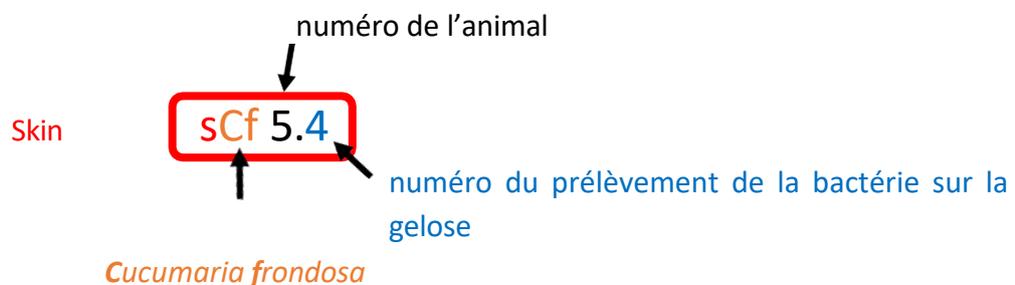


Figure 1: pourcentage représentant l'origine des isolats bactériens (cf: fluide coelomique; s: épiderme) chez l'holothurie a pieds oranges, *Cucumaria frondosa*.

12 isolats bactériens sont issus du liquide coelomique et 36 de l'épiderme. Il est à ce stade de l'étude impossible d'estimer une concentration moyenne de la « concentration » en bactérie dans ces deux compartiments anatomiques en raison d'une part du trop faible échantillonnage animalier (n=5) et d'autre part en raison de l'hétérogénéité du résultat du dénombrement des cultures (fig. 2). Dans cette étude préliminaire sur le microbiote de *C. frondosa*, nous n'avons pas dissocié dans notre analyse les isolats provenant du liquide coelomique de ceux issus de l'épiderme.

La nomenclature adoptée pour l'appellation des souches bactériennes est la suivante : « S= skin=épiderme », « cf=coelomic fluid=liquide ceolomique » : exemple ci-dessous et voir annexe 3



La figure 2 correspond à un étalement de 100uL d'écouvillonnage dilué au 1/10^{ème}. Il s'agit de deux prélèvements issus d'animaux différents, force est de constater une hétérogénéité dans la « concentration » bactérienne initiale.

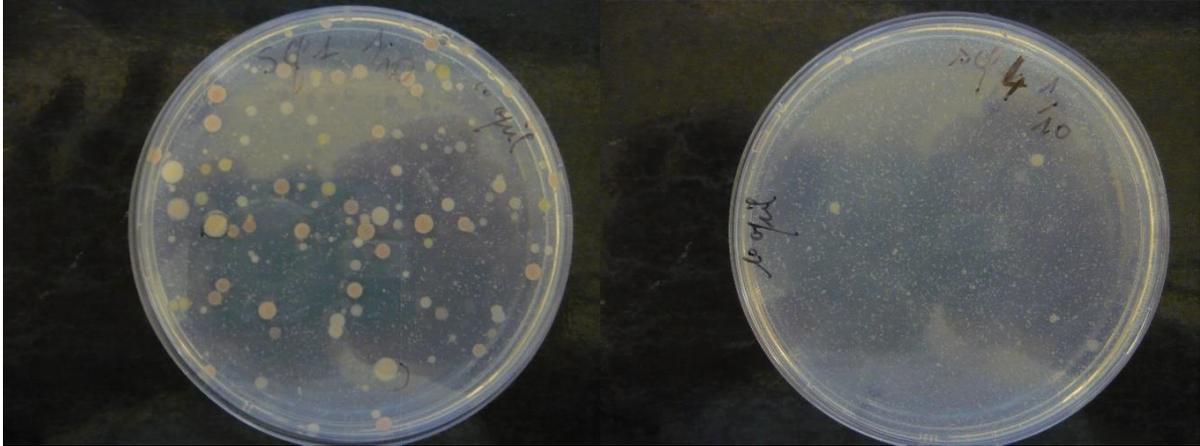


Figure 2: Exemple de culture bactérienne sur milieu MA: 100uL d'un prélèvement de l'épiderme (1/10) . à gauche animal n°1, à droite animal n°4

Afin d'établir la collection, des colonies de morphologies, de couleurs différentes sont prélevées puis étalées par quartile sur milieu gélosé(fig.3).

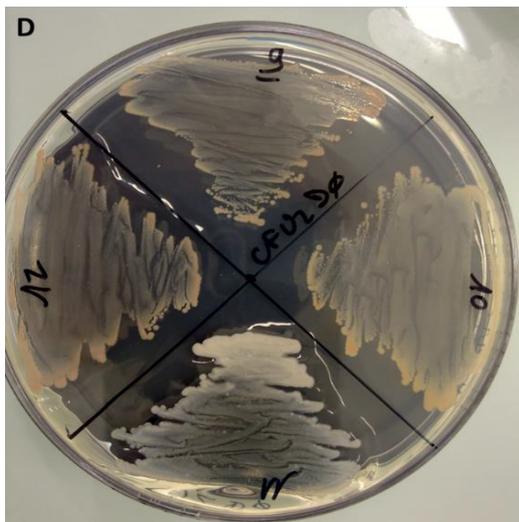


Figure 3: exemple de culture de souches pures bactériennes sur milieu gélosé

Les isolats bactériens sont conditionnés dans des cryotubes et conservés à -80°C.

III.2 Identification des souches bactériennes isolées

Au total, 42 souches ont été identifiées sur les 48, soit 88%. Des souches n'ont pas pu être identifiées, parce qu'elles n'ont pas résistées aux remises en culture lors des repiquages successifs. Deux souches (n°27 et 46) sont toujours en cours d'analyse.

La hiérarchisation taxonomique est rappelée en annexe 2.

L'identification des souches a été réalisée par séquençage de l'ADNr 16S suivi d'une analyse via BLAST-NCBI. Préalablement à l'envoi des produits PCR par courrier postal à Ebersberg en Allemagne chez Genomics Eurofins, la présence et la taille des amplicons des ADNr16S sont vérifiés. Une taille de 1500 pb est attendue pour continuer l'analyse génomique (fig.4). Parallèlement à cette approche de génomique ciblée, des identifications par Malditof ont été faites. Toutefois la base de données de l'appareil du laboratoire étant en phase d'incrémentation, ce sont les résultats obtenus par l'outil BLAST qui seront la base des graphiques présentés dans ce rapport.

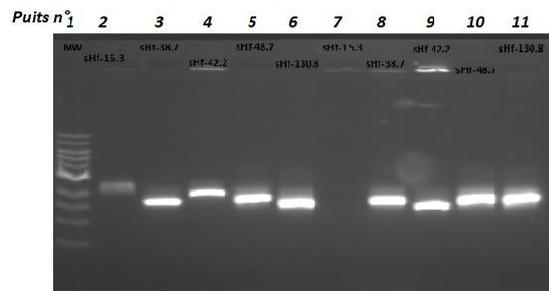


Figure 4: exemple d'électrophorèse de contrôle de la taille des amplicons

40 souches appartiennent à la **classe** des Gammaproteobacteria, on constate que cette classe taxonomique est largement dominante au sein du microbiote étudié, tandis que 2 souches bactériennes appartiennent à celle des Flavobacteriia, groupe largement minoritaire. Au rang taxonomique de l'**ordre**, les Alteromonadales représentent 2/3 des souches (n= 28), suivies des Vibrionales qui représentent environ 1/4 des souches (n=10). L'ordre des Pseudomonadales et des Flavobacteriales assurent de manière équitable les 10 % restants (fig.4).

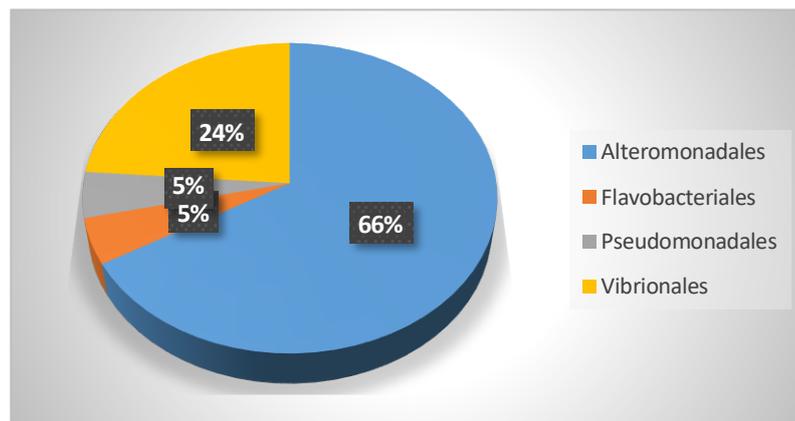


Figure 5: distribution des souches au niveau du rang taxonomique de l'ordre

L'identification au **genre** fait ressortir 12 genres : *Alginatibacterium*, *Aliivibrio*, *Alteromonas*, *Moritella*, *Nonlabens*, *Photobacterium*, *Psychrobacter*, *Psychromonas*, *Shewanella*, *Thalassomonas*, *Thalassotalea* et *Vibrio* (fig.5). Mais environ 25% sont à attribuer au genre *Shewanella*.

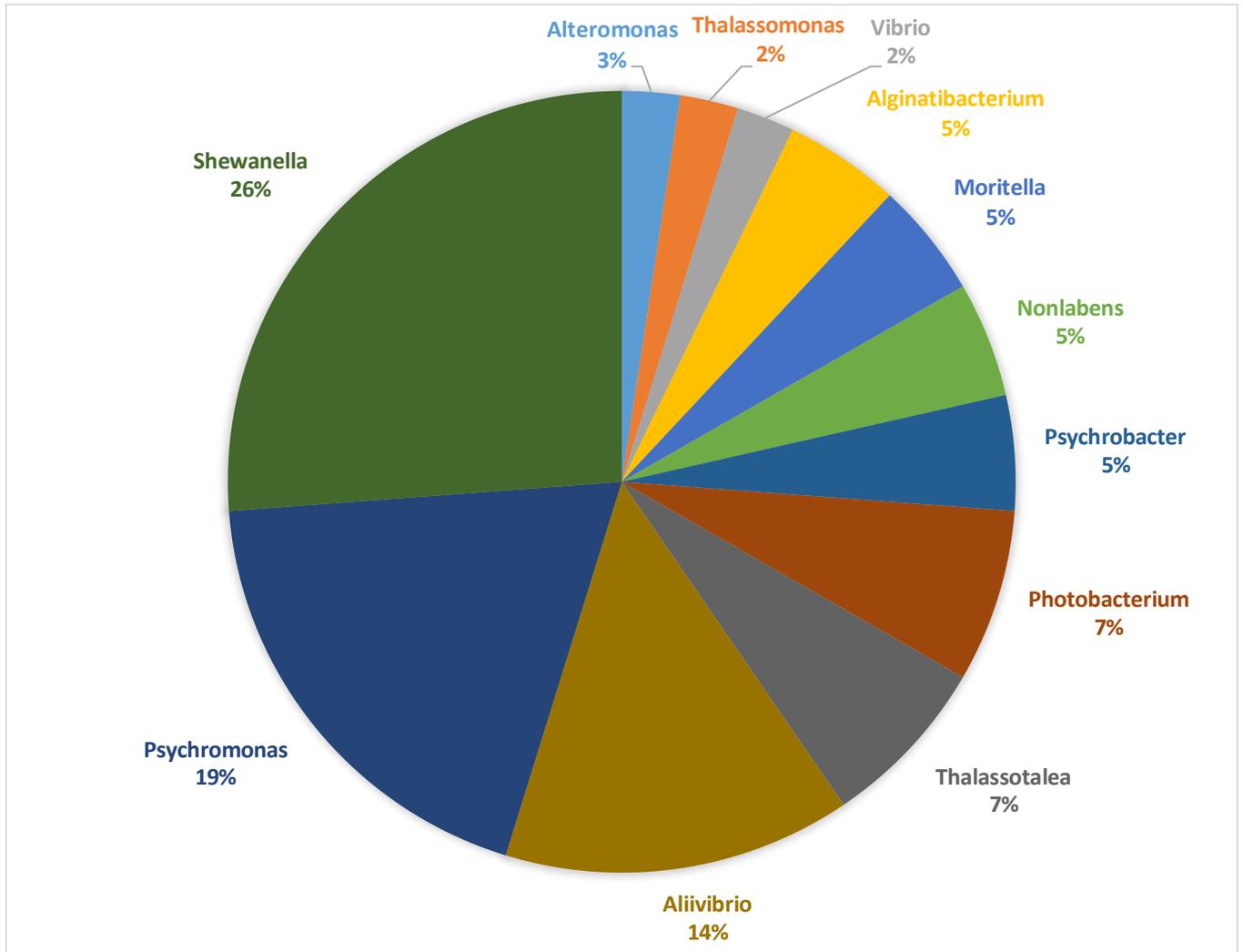


Figure 6: Pourcentage des souches affiliées à un genre bactérien

Pour finaliser l'affiliation taxonomique à l'espèce des souches bactériennes, l'ensemble des séquences d'ADNr16S a été comparé à celles engrangées dans une banque en ligne en ne ciblant que les souches types (NCBI-BLASTX- voir ci-dessous).

Choose Search Set

Database

Standard databases (nr etc.):
 rRNA/ITS databases
 Genomic + transcript databases
 Betacoronavirus
 Experimental databases

16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)
 [? Targeted Loci Project Information](#)

L'histogramme ci-dessous rassemble les résultats obtenus concernant l'espèce (fig. 6) : au total, 20 espèces ont été recensés avec un taux d'identité supérieure à 98% confirmant ainsi la nature de la souche.

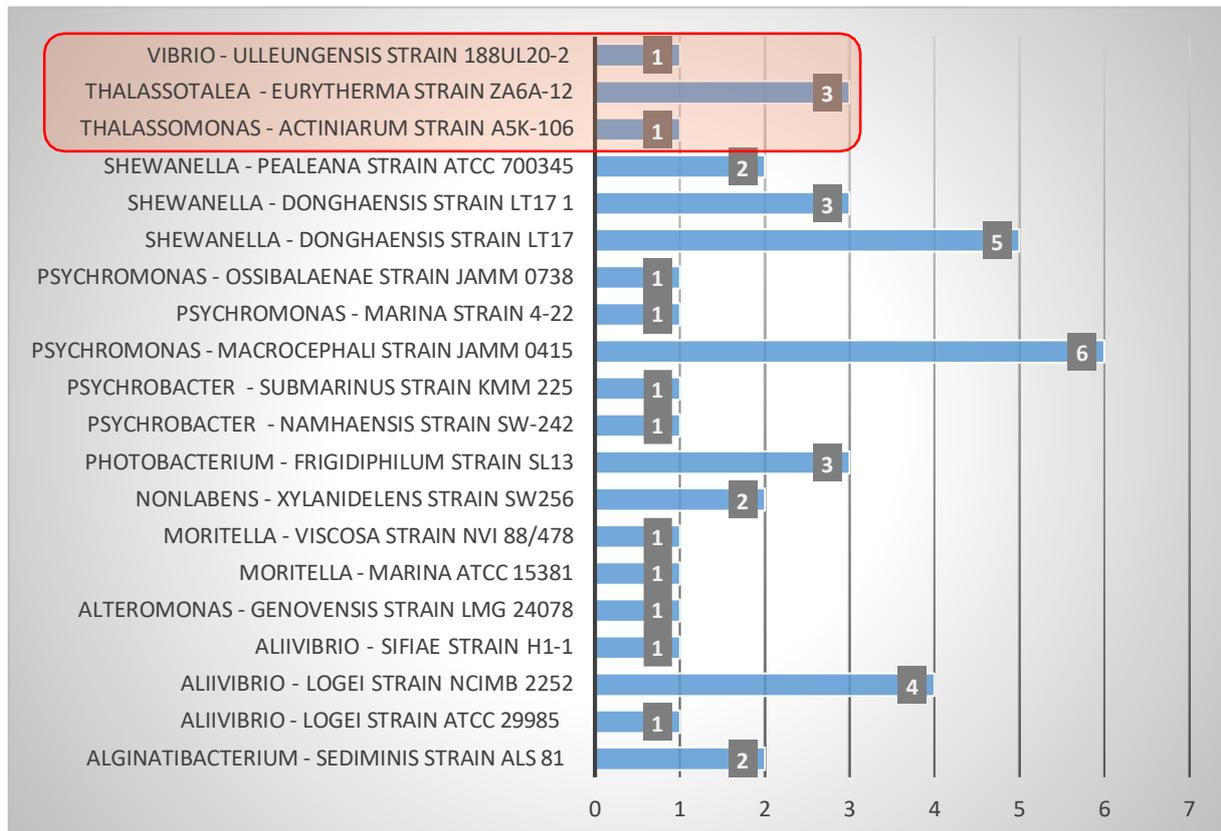


Figure 7: Affiliation taxonomique au rang de l'espèce (référence avec des souches types) A gauche souche de référence type, à droite nombre de représentants dans la collection. Le rectangle en rose précise l'incertitude de l'affiliation au rang de l'espèce.

Toutefois, 5 souches bactériennes ont présenté des % d'identité en de ça des 98%, aux alentours de 96% (fig. 6, carré rose).

Cela pourrait signifier que nous sommes en présence de nouvelles espèces (tab. 1).

Tableau 1: souches bactériennes de la collection présentant des % d'identité inférieur à 98%

| N° Souche | Nom | %identité | Souche type le plus proche |
|-----------|---------|-----------|--|
| 8 | cfCf5.4 | 95,04 | <i>Vibrio ulleungensis strain 188UL20-2</i> |
| 29 | sCf3.3 | 96,66 | <i>Thalassomonas actiniarum strain A5K-106</i> |
| 12 | cfCf5.8 | 95,69 | <i>Thalassotalea eurytherma strain Za6a-12</i> |
| 15 | sCf1.3 | 95,89 | <i>Thalassotalea eurytherma strain Za6a-12</i> |
| 33 | sCf4.1 | 95,82 | <i>Thalassotalea eurytherma strain Za6a-12</i> |

Ce sont 3 genres qui sont observés : *Thalassomonas*, *Thalassotalea* et *Vibrio*. Une seule souche provient du liquide coelomique, souche 8.

Un dendrogramme a été élaboré à partir de l'analyse de spectrométrie de masse Maldi-Tof, et ce malgré le manque de souches type d'origine marine dans la base de données de l'appareil Brucker. La figure 8 nous précise la parenté des souches isolées et conforte ainsi l'analyse de génomique ciblée, méthode Sanger.

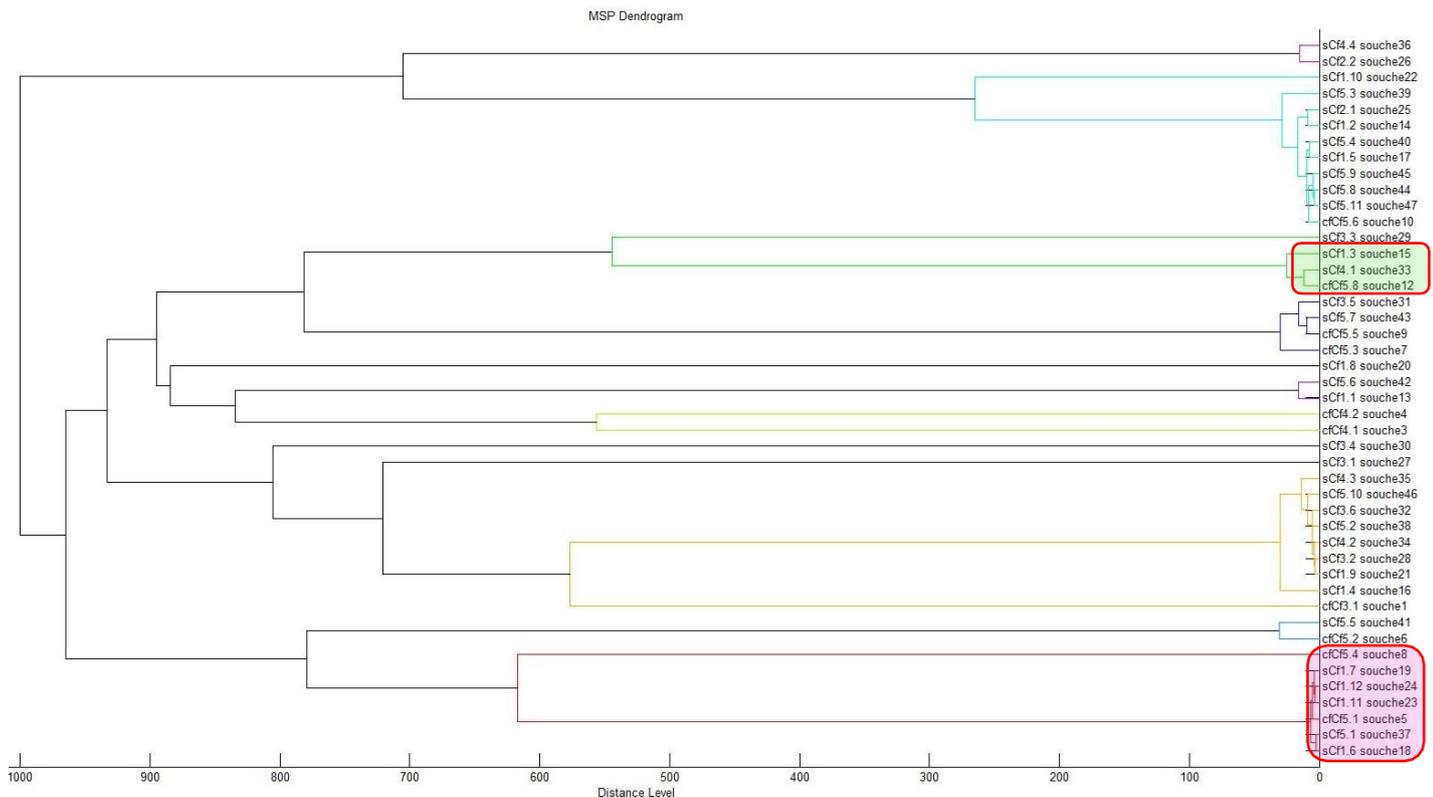


Figure 8: dendrogramme fourni par l'analyse des protéines ribosomales des souches de la collection bactérienne

La souche 8 (cfCf5.4) de genre *Vibrio* mais dont l'espèce est indéterminée apparaît bien dans le cluster de la famille des *Vibrionaceae* (voir carré rose fig.8) avec les souches affiliées au genre *Aliivibrio*.

Selon une approche similaire, les souches 12-15-33 respectivement (cfCf5.8, sCf1.3 & sCf4.1) de genre *Thalassotalea* mais dont l'espèce reste indéterminée (donc vraisemblablement nouvelle espèce) sont bien regroupées au sein d'un même cluster (voir carré vert fig.8). Par ailleurs, la souche 29 (sCf3.3) de genre *Thalassomonas*, espèce indéfinie, présente bien une parenté taxonomique avec celles présentées précédemment (voir carré vert fig.8) en étant affiliée à la famille des *Colwelliaceae*, incluant le genre *thalassotalea*.

En ce qui concerne le cluster des 3 bactéries affiliées au genre *Thalassotalea*, il est intéressant de notifier que ces 3 souches proviennent d'animaux différents.

IV Conclusion

Le projet dans ces objectifs initiaux comprenait deux parties : d'une part (i) tester l'innocuité de trois souches bactériennes du LBCM sur des juvéniles de saumon et d'autre part (ii) générer une collection d'isolats bactériens à partir de prélèvements biologiques du concombre de mer à pieds oranges, *C. Frondosa*.

- (i) En raison d'un réaménagement des locaux de la station aquacole de Bodø où sont menées les expérimentations de zootechnie, la première partie du projet a donc été reconduite à une date ultérieure.
- (ii) En ce qui concerne la deuxième partie, la collection bactérienne est composée de 44 souches, bactéries à Gram-. La détermination taxonomique au rang du genre oriente bien vers des bactéries marines halophiles caractéristiques de zones froides (la température moyenne du milieu environnemental est d'environ 5°C). Malgré un échantillonnage restreint en animaux (n=5), ce sont 12 genres bactériens qui ont été recensés et 20 espèces. Néanmoins, environ 10% des souches bactériennes de la collection n'a pu être affilié phylogénétiquement au rang de l'espèce (fig.9).

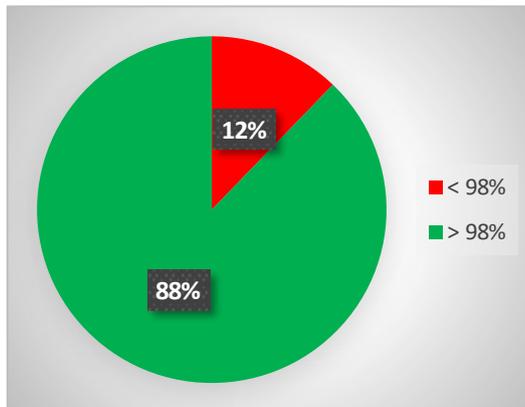


Figure 9: identification des bactéries par espèce : la zone rouge correspond à un pourcentage d'identité d'environ 95%

Ce constat peut s'expliquer par le fait qu'aucune étude n'a été réalisée sur la biodiversité du microbiote concombre de mer à pieds oranges, *C. Frondosa*.

A faire :

- Au LBCM : criblage antimicrobien de la collection contre des pathogènes aquacoles
- A la Mørkvedbukta research station, tester l'innocuité des 3 souches* du LBCM sur des larves de poissons

* : les souches ont été expédiées par l'Institut Pasteur et bien réceptionnées à Mørkvedbukta research station

SWOT du projet

Forces :

- Le projet était élaboré à partir d'une réelle demande économique qui s'inscrivait dans une logique de développement durable (l'interdiction de l'utilisation des composés antibiotiques au profit des probiotiques en Norvège).
- Sur le plan scientifique, le projet s'appuyait sur des compétences acquises au LBCM au fil des années dans la thématique des probiotiques d'origine bactérienne
- Sur la plan relationnel, un passif solide basé sur des relations humaines confortait la réalisation du projet (collaboration norvégienne).
- Le projet dans son contenu était ambitieux (d'où son intérêt) voire trop copieux...

Faiblesses :

- Travailler sur du vivant n'est jamais aisé et notamment en raison des contraintes zootechniques. L'accès à du matériel d'élevage et à des alevins n'a pas été possible sur le temps imparti au projet (restructuration des locaux, déménagement ...). Ainsi la partie du projet concernant l'innocuité de nos souches sur des larves de poisson n'a pu être réalisée.
- Un aspect temporel non négligeable est « de se rendre disponible », quand caler les manips ? Malgré de nombreuses visioconférences et de manière consensuelle une période et une durée ont été déterminées à savoir un séjour de 6 jours à Bodø : trop court pour mener à terme des manips sur site ! (Vacances de printemps) : la solution un étudiante, Link
- Nous avons tenté de recruter un Master II norvégien en complément de ce projet « Call for Projects 2024 - SEA-EU-search@9 », en vain. Les dispositifs pédagogiques du Master II diffèrent entre la Norvège et la France, en terme de durée et contenu. En Norvège, le master s'intitule « *Master Thesis* » dont le contenu va bien au-delà d'un stage français de Master II.
- L'avancée du projet nécessite du **présentiel**.

Opportunités

La participation de ce projet a mis en exergue des points à améliorer, à oublier.

- La connaissance de l'infrastructure locale permettra de mieux dimensionner un futur projet (exemple : impossibilité de faire des challenges infectieux)
- A notre connaissance, la littérature scientifique ne fait pas état d'étude sur le microbiote bactérien du concombre de mer à pieds oranges, *C. Frondosa*. En revanche, bon nombres d'articles relatent de la biologie et de l'intérêt économique chez cette holothurie.
- Ainsi, avec mon collègue K Korsnes, on se pose la question de la rédaction d'un projet sous format PHC (programme Aurora)
- Une opportunité de rédaction d'articles : en raison de l'isolement de souches bactériennes dont l'espèce est indéterminée. Nous allons rédiger un voire deux articles dans IJSEM pour une déclaration de nouvelles espèces bactériennes (2 à minima : *Thalassomonas* sp & *Thalassotalea* sp).
- K Korsnes et V. Verhac-Trichet se proposent de participer aux " International Days" qui auront lieu les **2,3 et 4 Avril 2025** à l'IUT de Quimper. <https://nouveau.univ-brest.fr/iut-quimper/fr/page/international-days>.

Menaces

Bibliographie

- Adewole, D., Akinyemi, F.,** 2021. Gut Microbiota Dynamics, Growth Performance, and Gut Morphology in Broiler Chickens Fed Diets Varying in Energy Density with or without Bacitracin Methylene Disalicylate (BMD). *Microorganisms* 9, 787. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040787>
- Adorian, T.J., Jamali, H., Farsani, H.G., Darvishi, P., Hasanpour, S., Bagheri, T., Roozbehfar, R.,** 2019. Effects of Probiotic Bacteria Bacillus on Growth Performance, Digestive Enzyme Activity, and Hematological Parameters of Asian Sea Bass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Probiotics & Antimicro. Prot.* 11, 248–255. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9393-z>
- Al-Shawi, S.G., Dang, D.S., Yousif, A.Y., Al-Younis, Z.K., Najm, T.A., Matarneh, S.K.,** 2020. The Potential Use of Probiotics to Improve Animal Health, Efficiency, and Meat Quality: A Review. *Agriculture* 10, 452. <https://doi.org/10.3390/agriculture10100452>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J.,** 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Chi, C., Liu, J.-Y., Fei, S.-Z., Zhang, C., Chang, Y.-Q., Liu, X.-L., Wang, G.-X.,** 2014. Effect of intestinal autochthonous probiotics isolated from the gut of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) on immune response and growth of *A. japonicus*. *Fish & Shellfish Immunology* 38, 367–373. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.04.001>
- Chiarello, M., Auguet, J.-C., Bettarel, Y., Bouvier, C., Claverie, T., Graham, N.A.J., Rieuvilleneuve, F., Sucre, E., Bouvier, T., Villéger, S.,** 2018. Skin microbiome of coral reef fish is highly variable and driven by host phylogeny and diet. *Microbiome* 6, 147. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0530-4>
- de Souza Vandenberghe, L.P., Garcia, L.M.B., Rodrigues, C., Camara, M.C., de Melo Pereira, G.V., de Oliveira, J., Soccol, C.R.,** 2017. Potential applications of plant probiotic microorganisms in agriculture and forestry. *AIMS Microbiol* 3, 629–648. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.629>
- Enomoto, M., Nakagawa, S., Sawabe, T.,** 2012. Microbial Communities Associated with Holothurians: Presence of Unique Bacteria in the Coelomic Fluid. *Microbes and environments* 27, 300–305. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME12020>
- Gill, H.S., Guarner, F.,** 2004. Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgraduate Medical Journal* 80, 516–526. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2003.008664>
- Gravet, A., Gessier, M.,** 2013. Spectrométrie de masse et microbiologie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 28, 297–308. <https://doi.org/10.1016/j.immbio.2013.09.003>
- Hai, N.V.,** 2015. The use of probiotics in aquaculture. *J Appl Microbiol* 119, 917–935. <https://doi.org/10.1111/jam.12886>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E.,** 2014. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11, 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Huerta-Rábago, J.A., Martínez-Porchas, M., Miranda-Baeza, A., Nieves-Soto, M., Rivas-Vega, M.E., Martínez-Córdova, L.R.,** 2019. Addition of commercial probiotic in a biofloc shrimp farm of *Litopenaeus vannamei* during the nursery phase: Effect on bacterial diversity using massive sequencing 16S rRNA. *Aquaculture* 502, 391–399. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.055>
- Instruction for use Brucker Bacterial Test Standard,** 2012.
- FAO WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food (Ed.), 2006. *Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation*
- Kapareiko, D., Alix, J., Jeffress, D., Wikfors, G.,** 2012. EVALUATION OF A BACILLUS SP PROBIOTIC CANDIDATE UPON SURVIVAL OF OYSTER LARVAE (*CRASSOSTREA VIRGINICA*) DURING PILOT-SCALE TRIALS AND ITS EFFECTS UPON OYSTER HEMOCYTE IMMUNE FUNCTIONS. *Journal of Shellfish Research* 31, 303–303.
- Kerry, R.G., Patra, J.K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H.-S., Das, G.,** 2018. Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food and Drug Analysis* 26, 927–939. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.002>
- Limborg, M.T., Alberdi, A., Kodama, M., Roggenbuck, M., Kristiansen, K., Gilbert, M.T.P.,** 2018. Applied Hologenomics: Feasibility and Potential in Aquaculture. *Trends in Biotechnology* 36, 252–264. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.12.006>
- Mullis, K.B., Faloona, F.A.,** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, in: *Methods in Enzymology, Recombinant DNA Part F*. Academic Press, pp. 335–350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)

- Nguyen, H.T., Nguyen, T.T., Pham, H.T.T., Nguyen, Q.T.N., Tran, M.T., Nguyen, A.H., Phan, T.N., Bui, H.T.V., Dao, H.T.T., Nguyen, A.T.V.,** 2018. Fate of carotenoid-producing *Bacillus aquimaris* SH6 colour spores in shrimp gut and their dose-dependent probiotic activities. *PLOS ONE* 13, e0209341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209341>
- Offret, C., Jégou, C., Mounier, J., Fleury, Y., Le Chevalier, P.,** 2019a. New insights into the haemo- and coelomicrobiota with antimicrobial activities from Echinodermata and Mollusca. *J Appl Microbiol* 126, 1023–1031. <https://doi.org/10.1111/jam.14184>
- Offret, C., Rochard, V., Laguerre, H., Mounier, J., Huchette, S., Brillet, B., Le Chevalier, P., Fleury, Y.,** 2019b. Protective Efficacy of a *Pseudoalteromonas* Strain in European Abalone, *Haliotis tuberculata*, Infected with *Vibrio harveyi* ORM4. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 11, 239–247. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9389-8>
- Paillard, C., Korsnes, K., Le Chevalier, P., Le Boulay, C., Harkestad, L., Eriksen, A.G., Willassen, E., Bergh, Ø., Bovo, C., Skår, C., Mortensen, S.,** 2008. *Vibrio tapetis*-like strain isolated from introduced Manila clams *Ruditapes philippinarum* showing symptoms of brown ring disease in Norway. *Dis Aquat Organ* 81, 153–161. <https://doi.org/10.3354/dao01950>
- Rebollar, E.A., Gutiérrez-Preciado, A., Noecker, C., Eng, A., Hughey, M.C., Medina, D., Walke, J.B., Borenstein, E., Jensen, R.V., Belden, L.K., Harris, R.N.,** 2018. The Skin Microbiome of the Neotropical Frog *Craugastor fitzingeri*: Inferring Potential Bacterial-Host-Pathogen Interactions From Metagenomic Data. *Front. Microbiol.* 9, 466. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00466>
- Reilly, P., O'Doherty, J.V., Pierce, K.M., Callan, J.J., O'Sullivan, J.T., Sweeney, T.,** 2008. The effects of seaweed extract inclusion on gut morphology, selected intestinal microbiota, nutrient digestibility, volatile fatty acid concentrations and the immune status of the weaned pig. *animal* 2, 1465–1473. <https://doi.org/10.1017/S1751731108002711>
- Sanders, M.E.,** 2008. Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. *Clinical Infectious Diseases* 46, S58–S61. <https://doi.org/10.1086/523341>
- Smith, L.C., Arizza, V., Barela Hudgell, M.A., Barone, G., Bodnar, A.G., Buckley, K.M., Cunsolo, V., Dheilly, N.M., Franchi, N., Fugmann, S.D., Furukawa, R., Garcia-Ararras, J., Henson, J.H., Hibino, T., Irons, Z.H., Li, C., Lun, C.M., Majeske, A.J., Oren, M., Pagliara, P., Pinsino, A., Raftos, D.A., Rast, J.P., Samasa, B., Schillaci, D., Schrankel, C.S., Stabili, L., Stensvåg, K., Sutton, E.,** 2018. Echinodermata: The Complex Immune System in Echinoderms, in: Cooper, E.L. (Ed.), *Advances in Comparative Immunology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 409–501. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76768-0_13
- Tarnecki, A.M., Wafapoor, M., Phillips, R.N., Rhody, N.R.,** 2019. Benefits of a *Bacillus* probiotic to larval fish survival and transport stress resistance. *Scientific Reports* 9, 4892. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39316-1>
- The success recipe for eradicating antibiotics in Norwegian salmon farming,** 2022. URL <https://en.seafood.no/news-and-media/news-archiv/the-success-recipe-for-eradicating-antibiotics-in-norwegian-salmon-farming/> (accessed 11.13.24).
- Turnbaugh, P.J., Gordon, J.I.,** 2009. The core gut microbiome, energy balance and obesity: The core gut microbiome, energy balance and obesity. *The Journal of Physiology* 587, 4153–4158. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.174136>
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W.,** 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 655–671.
- Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H.,** 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiology Reviews* 30, 404–427. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00017.x>
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J.,** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173, 697–703.
- Woo, S.L., Pepe, O.,** 2018. Microbial Consortia: Promising Probiotics as Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Plant Science* 9, 1801. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01801>
- Zhao, Y., Yuan, L., Wan, J., Sun, Z., Wang, Y., Sun, H.,** 2016. Effects of potential probiotic *Bacillus cereus* EN25 on growth, immunity and disease resistance of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish & Shellfish Immunology* 49, 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.12.035>

Annexe 1

Vi gjør oppmerksom på at denne artikkelen er over to år gammel, og kan ha innhold som er utdatert.

Jonathan Hira disputerte for graden PhD i naturvitenskap med avhandlingen *"Host-Pathogen Interaction - Sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) lesion syndrome and *Vibrio* bacteria"* den 10. desember 2019. Hans prøveforelesning med tittelen *"Various ways that marine invertebrates combat bacterial infections and bacterial toxins"* var samme dag.

Veilederne har vært professor Klara Stensvåg (NFH), professor Bjarne Landfald (NFH), førsteamanuensis Tor Haug (NFH), professor Olaf B. Styrvold (NFH) og Dr. Chun Li (NFH). Bedømmelseskomitéen bestod av førsteamanuensis Patrick Le Chevalier (Université Bretagne Occidentale) som førsteopponent, Dr. Lars Martin Jakt (Nord Universitet) som andreopponent og Dr. Eva-Stina Isabella Edholm (NFH) som internt medlem og leder av komiteen. Disputasen ble ledet av instituttleder Terje Martinussen (NFH).



Hira med veiledere, bedømmelseskomité og leder av disputas.

FOTO: JONATAN OTTESEN



UiT The Arctic University of Norway

SEARCH MENU ☰

uit.no / Tavlå / Disputas - MSc Jonathan Hira

Disputas - MSc Jonathan Hira

MSc Jonathan Hira ved NFH vil offentlig forsvare for ph.d.-graden i naturvitenskap, avhandlingen:

"Host-Pathogen Interaction - Sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) lesion syndrome and *Vibrio* bacteria"

Veiledere:

- Professor Klara Stensvåg, NFH
- Professor Bjarne Landfald, NFH
- Førsteamanuensis Tor Haug, NFH
- Professor Olaf B. Styrvold, NFH
- Dr. Chun Li, NFH

Bedømmelseskomité:

- Førsteamanuensis Patrick Le Chevalier, Université Bretagne Occidentale, France (1 opponent)
- Dr. Lars Martin Jakt, Nord Universitet (2 opponent)
- Dr. Eva-Stina Isabella Edholm, NFH (internt medlem og leder av komiteen)

Disputasen vil bli avholdt på engelsk og vil bli ledet av instituttleder Terje Martinussen ved Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi.

When: 10.12.19 at 12.15–15.00
Where: Lille auditorium (E-102), NFH-bygget
Location / Campus: Tromsø
Target group: Employees, Students, Guests, Unit
Contact: Ingjerd Gauslaa Nilsen
Phone: 776 46018
E-mail: ingjerd.nilsen@uit.no

📅 [Add to calendar](#)

Annexe 2



Concombre de mer à pieds oranges, *Cucumaria frondosa*, dont les tentacules de forme dendritique sont visibles



Collecte du liquide cœlomique (CF-Coelomic fluid) par la face dorsale à l'aide d'une seringue

Annexe 3

| hiérarchisation taxonomique | | | | | |
|-----------------------------|--------|-------|---------|-------|--------|
| Phylum | Classe | ordre | famille | genre | espèce |

Annexe 4

Liste des souches bactériennes

| Souche | Nom | Amplicon pb | % identity | BLAST genre | BLAST espèce | % identité |
|--------|---------|-------------|------------|-------------------|-------------------------------|------------|
| 41 | sCf5.5 | 1300 | 99,15 | Alginatibacterium | sediminis strain ALS 81 | > 98% |
| 6 | cfCf5.2 | 1443 | 99,65 | Alginatibacterium | sediminis strain ALS 81 | > 98% |
| 19 | sCf1.7 | 1440 | 99,57 | Aliivibrio | logei strain NCIMB 2252 | > 98% |
| 37 | sCf5.1 | 1436 | 98,67 | Aliivibrio | logei strain ATCC 29985 | > 98% |
| 24 | sCf1.12 | 1440 | 99,43 | Aliivibrio | logei strain NCIMB 2252 | > 98% |
| 18 | sCf1.6 | 1443 | 99,57 | Aliivibrio | logei strain NCIMB 2252 | > 98% |
| 23 | sCf1.11 | 1433 | 99,57 | Aliivibrio | logei strain NCIMB 2252 | > 98% |
| 5 | cfCf5.1 | 1437 | 99,43 | Aliivibrio | sifiae strain H1-1 | > 98% |
| 20 | sCf1.8 | 1427 | 99,51 | Alteromonas | genovensis strain LMG 24078 | > 98% |
| 9 | cfCf5.5 | 1442 | 99,65 | Moritella | marina ATCC 15381 | > 98% |
| 7 | cfCf5.7 | 1431 | 98,95 | Moritella | viscosa strain NVI 88/478 | > 98% |
| 30 | sCf3.4 | 1413 | 99,29 | Nonlabens | xylanidelens strain SW256 | > 98% |
| 31 | sCf3.5 | 1422 | 99,29 | Nonlabens | xylanidelens strain SW256 | > 98% |
| 13 | sCf1.1 | 1431 | 99,23 | Photobacterium | frigidiophilum strain SL13 | > 98% |
| 42 | sCf5.6 | 1431 | 99,3 | Photobacterium | frigidiophilum strain SL13 | > 98% |
| 43 | sCf5.7 | 1436 | 99,3 | Photobacterium | frigidiophilum strain SL13 | > 98% |
| 4 | cfCf4.2 | 1437 | 99,16 | Psychrobacter | namhaensis strain SW-242 | > 98% |
| 3 | cfCf4.1 | 1404 | 99,56 | Psychrobacter | submarinus strain KMM 225 | > 98% |
| 21 | sCf1.9 | 1253 | 98,88 | Psychromonas | macrocephali strain JAMM 0415 | > 98% |
| 28 | sCf3.2 | 1162 | 98,71 | Psychromonas | macrocephali strain JAMM 0415 | > 98% |
| 34 | sCf4.2 | 1183 | 98,73 | Psychromonas | macrocephali strain JAMM 0415 | > 98% |
| 35 | sCf4.3 | 1170 | 98,73 | Psychromonas | macrocephali strain JAMM 0415 | > 98% |
| 32 | sCf3.6 | 1148 | 98,69 | Psychromonas | macrocephali strain JAMM 0415 | > 98% |
| 38 | sCf5.2 | 1178 | 98,73 | Psychromonas | macrocephali strain JAMM 0415 | > 98% |
| 1 | cfCf3.1 | 1441 | 98,46 | Psychromonas | marina strain 4-22 | > 98% |
| 16 | sCf1.4 | 1444 | 98,34 | Psychromonas | ossibalaenae strain JAMM 0738 | > 98% |
| 25 | sCf2.1 | 1437 | 98,54 | Shewanella | donghaensis strain LT17 1 | > 98% |
| 17 | sCf1.5 | 1433 | 98,40 | Shewanella | donghaensis strain LT17 1 | > 98% |
| 22 | sCf1.10 | 1009 | 98,40 | Shewanella | donghaensis strain LT17 1 | > 98% |
| 10 | cfCf5.6 | 1435 | 98,75 | Shewanella | donghaensis strain LT17 | > 98% |
| 39 | sCf5.3 | 1432 | 98,46 | Shewanella | donghaensis strain LT17 | > 98% |
| 44 | sCf5.8 | 1184 | 98,4 | Shewanella | donghaensis strain LT17 | > 98% |
| 40 | sCf5.4 | 1431 | 98,46 | Shewanella | donghaensis strain LT17 | > 98% |
| 45 | sCf5.9 | 1432 | 98,4 | Shewanella | donghaensis strain LT17 | > 98% |
| 47 | sCf5.11 | 1433 | 98,5 | Shewanella | donghaensis strain LT17 | > 98% |
| 26 | sCf2.2 | 1427 | 98,31 | Shewanella | pealeana strain ATCC 700345 | > 98% |
| 36 | sCf4.4 | 1431 | 98,46 | Shewanella | pealeana strain ATCC 700345 | > 98% |

| | | | | | | |
|----|---------|------|-------|-----------------|-------------------------------|-------|
| 29 | sCf3.3 | 1142 | 96,66 | Thalassomonas | actiniarum strain A5K-106 | < 98% |
| 33 | sCf4.1 | 1436 | 95,69 | Thalassotalea | eurytherma strain Za6a-12 | < 98% |
| 12 | cfCf5.8 | 1440 | 95,89 | Thalassotalea | eurytherma strain Za6a-12 | < 98% |
| 15 | sCf1.3 | 1145 | 95,82 | Thalassotalea | eurytherma strain Za6a-12 | < 98% |
| 8 | cfCf5.4 | 1453 | 95,04 | Vibrio | ulleungensis strain 188UL20-2 | < 98% |
| 27 | scF3.1 | 60 | ? | ? | | |
| 46 | scf5.10 | 210 | ? | Psychromonas ?? | | |

